

Untersuchung zur Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nach fokaler transienter Ischämie bei der Ratte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der

Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Sigrid Schindler

geboren am 12. September 1973, in Stuttgart

10.2.2005

Erster Gutachter: PD Dr. Ch. Redecker
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. G. Jirikowski
Dritter Gutachter: Prof. Dr. R. Köhling

Tag der öffentlichen Verteidigung: 1. November 2005

Verzeichnis der Abkürzungen

AB	Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplex
CCA	A. carotis communis
DAB	3,3-Diaminobenzidin
FR	primär motorischer Kortex
GABA	γ -Aminobuttersäure
HL	Hinterpfotenrepräsentationskortex
ICA	A. carotis interna
LTP	Langzeitpotenzierung
MCA	A. cerebri media
MCAO	transienten Okklusionen der A. cerebri media
MK-801	nicht kompetitiver Antagonist des NMDA-Rezeptors
NGS	normales Ziegenserum
NMDA	N-Methyl-D-Asparaginsäure
NeuN	neuronaler Marker zur immunhistochemischen Anfärbung
Par1	primär somatosensorischer Kortex
Par2	sekundär somatosensorischer Kortex
PB	Phosphatpuffer
PBS	phosphatgepufferte Normalsalzlösung
PFA	Fixationslösung für transkardiale Perfusion
ROD	relative optische Dichte
rt-PA	recombinant tissue plasminogen activator
SPF	spezifisch pathogenfreie Haltungsbedingungen
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG	3
3	ZIELSETZUNG UND AUFGABENSTELLUNG	10
4	MATERIAL UND METHODEN	11
4.1	Versuchstiere	11
4.2	Induktion fokaler Ischämien	11
4.2.1	Das intraluminale Filament	12
4.2.2	Anästhesie und Temperaturkontrolle	12
4.2.3	Operation	12
4.3	Gewebebegewinnung	15
4.3.1	Perfusionslösungen	15
4.3.2	Transkardiale Perfusion	15
4.3.3	Inkubation und Einfrieren der Gehirne	16
4.4	Färbemethoden	17
4.4.1	Herstellung der Schnitte	17
4.4.2	Färbemedien	18
4.4.3	Kresylviolett-färbung nach Nissl	19
4.4.4	Immunhistochemische Färbungen	19
4.4.5	Aufziehen und Eindecken der Schnitte	21
4.5	Analyse der morphologischen und immunhistochemischen Daten	21
4.5.1	Messungen und lichtmikroskopische Auswertung	21
4.5.2	Statistische Auswertung	23
5	ERGEBNISSE	25
5.1	Morphologie der Infarkte nach MCAO	25
5.2	Verteilung der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$	26
5.2.1	Verteilung der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten im Gehirn der erwachsenen Ratte (Kontrollgruppe)	27
5.2.2	Verteilung der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten im ipsi- und kontralateralen Neokortex nach MCAO (Ischämiezeit: 30 Minuten bzw. 60 Minuten)	30

5.2.3	Verteilung der GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten in den ipsi- und kontralateralen subkortikalen Strukturen nach MCAO (Ischämiezeit: 30 bzw. 60 min)	40
6	DISKUSSION	45
6.1	Bihemisphärische Dysregulation	45
6.2	Heraufregulation von GABA _A -Rezeptor-Untereinheiten im strukturell intakten ipsilateralen Kortexgewebe des Medialstromgebietes bei kleinen subkortikalen Infarkten (Ischämiezeit: 30 min)	48
6.3	Veränderungen nach großen Infarkten mit kortikalen und subkortikalen Strukturverlusten (Ischämiezeit: 60 min)	49
6.4	Funktionelle Bedeutung	51
6.4.1	Veränderungen im GABAergen System	51
6.4.2	Veränderungen im teilischämischen Gewebe	53
6.4.3	Bedeutung für Rehabilitation und kortikale Plastizität	54
7	SCHLUSSFOLGERUNGEN	57
8	LITERATURVERZEICHNIS	59
9	DANKSAGUNG	67
10	LEBENS LAUF	68
11	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	69

1 Zusammenfassung

In der Umgebung kortikaler und subkortikaler Infarkte kommt es in strukturell intaktem Gewebe nach fokaler, transienter Ischämie zu einem Ungleichgewicht zwischen Exzitation und Inhibition im Sinne einer Reduktion der Inhibition. Die zerebrale Inhibition wird in erster Linie durch den Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) über den GABA_A-Rezeptor vermittelt. Der GABA_A-Rezeptor ist ein pentameres Protein, das durch die Zusammensetzung verschiedener Untereinheiten eine Vielzahl von adaptiven Anpassungsprozessen ermöglicht. In der vorliegenden Studie wurde die Expression von fünf wichtigen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$) nach fokalen ischämischen Hirninfarkten in verschiedenen kortikalen und subkortikalen Hirnregionen an der Ratte immunhistochemisch untersucht. Zur Induktion der fokalen Ischämie wurde eine transiente Okklusion der A. cerebri media (MCAO) durchgeführt, die es ermöglichte durch Variation der Okklusionszeit (30 Minuten bzw. 60 Minuten) die Infarktgröße zu beeinflussen. Im Vergleich mit einer schein-operierten Kontrollgruppe kam es nach einer 30-minütigen Durchblutungsunterbrechung, die kleine Infarkte nach sich zieht, ipsilateral zu einer Heraufregulation der Untereinheiten. Eine differenzielle Reduktion der Expression konnte im kontralateralen Kortex, im Hippokampus und Thalamus gezeigt werden. Auch nach einer 60-minütigen Okklusionszeit, die zu strukturellen Schäden im ipsilateralen Kortex und Striatum führt, kam es kontralateral zu einer spezifischen Dysregulation der Rezeptor-Untereinheiten. Dies äußerte sich in einer reduzierten Dichte der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ und einer signifikanten Heraufregulation der $\alpha 3$ -Untereinheit im kontralateralen Kortex.

Die vorliegende Studie zeigt, dass es nach fokalen ischämischen Hirninfarkten zu ausgedehnten Änderungen der Expression von GABA_A-Rezeptoren kommt, die weit über das strukturell geschädigte Areal hinausgehen und von der Dauer der

Durchblutungsstörung abhängen. Diese Veränderungen des GABAergen Systems leisten möglicherweise einen Beitrag zur Funktionserholung nach Hirninfarkten.

2 Einleitung

Der zerebrovaskuläre Insult gilt nach den kardialen und onkologischen Erkrankungen als dritthäufigste Todesursache in den Industrieländern. Er ist in Deutschland die häufigste neurologische Erkrankung des erwachsenen Patienten und zieht in vielen Fällen eine lebenslange Behinderung nach sich. Abhängig vom pathophysiologischen Mechanismus kann dem zerebrovaskulären Infarkt eine Ischämie oder Blutung zugrunde liegen. 80 % der Schlaganfälle werden durch Ischämien verursacht, 15 % durch Blutungen und 5 % haben andere Ursachen (Hamann, 2000). Dem ischämischen Geschehen können thrombotische zerebrale Ereignisse zu Grunde liegen, die meist Folge von arteriosklerotischen Schäden des zerebralen Gefäßsystems sind. Außerdem können sie durch arterielle Thromben verursacht werden, die mehrheitlich als Thrombus aus dem linken Vorhof (bei Vorhofflimmern) oder dem linken Ventrikel (bei einem Myokardinfarkt) den zerebralen Blutfluss stören. Auf dem Boden einer Ischämie kommt es zu fokalen zerebralen Funktionsausfällen, die von vorübergehenden Sprachstörungen und motorischen Funktionsdefiziten bis zu ganz- und halbseitigen motorischen Paresen mit vollständigen Ausfällen der sensorischen Fähigkeiten reichen.

Mit der Einführung der Revaskularisationstherapie mit rt-PA (recombinant tissue plasminogen activator) wurde die Akutbehandlung des ischämischen Insultes in den neunziger Jahren deutlich effizienter (Phan et al., 2002). Auch bei initial schwerster Symptomatik konnten sowohl die Überlebensrate als auch die Rehabilitationsergebnisse verbessert werden. Gegenwärtig wird die Lysetherapie allerdings bei weniger als 10 % der Patienten eingesetzt (European stroke unit), da das Zeitfenster für eine erfolgreiche Thrombolyse klein ist und sich auf die ersten drei Stunden nach Insultereignis beschränkt. Ferner ist die Empfehlung für diese Therapiemethode durch Kriterien geregelt, die den evidenten Einsatz gewährleisten. Infolgedessen spielen die Rehabilitationsmaßnahmen nach Abschluss der Akuttherapie eine zentrale Rolle in der Schlaganfalltherapie. Die klinische Erfah-

nung zeigt, dass sich funktionelle und neurologische Defizite, wie Schwäche oder eine Hemiparese der kontralateralen Extremität, nach Hirninfarkten binnen unterschiedlich langer Zeitintervalle zurückbilden können. Bis heute ist jedoch nicht geklärt, welche kortikalen Modifikationsprozesse dieser postischämischen Erholung zugrunde liegen. Beispielsweise ist immer noch unklar, warum der Grad der Erholung nach einem Infarkt unabhängig von seiner Ausdehnung und Lokalisation individuell stark variiert (Chollet und Weiller, 1994).

Das Gehirn ist kein starres, sondern ein funktionell dynamisches System, dessen Plastizität die Grundlage für ständige Lern-, Erholungs- und Anpassungsprozesse darstellt (Nudo et al., 2001). Das adulte zentrale Nervensystem ist in der Lage, sich zu reorganisieren und an veränderte Bedingungen anzupassen (Boroojerdi et al., 2001). Zahlreiche klinische und experimentelle Studien haben eine Steigerung der Plastizität nach ischämischen Insulten beobachtet (Liepert et al., 2000; Hallett, 2001; Chollet und Weiller, 1994; Nudo et al., 2001; Witte et al., 2000; Witte und Stoll, 1997; Herholz und Heiss, 2000; Cramer und Bastings, 2000; Chen et al., 2002). In diesen multifaktoriellen Prozess sind nicht nur die Veränderungen im Infarktgebiet selbst integriert, darüber hinaus kommt es zu bihemisphärischen funktionellen Anpassungsmechanismen des gesamten kortikalen Netzwerks (Witte et al., 2000; Witte und Stoll, 1997; Liepert et al., 2000; Reinecke et al., 2003).

Das Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen nach fokalen ischämischen Läsionen ist für eine optimale Rehabilitation von großer Bedeutung. In tierexperimentellen (Nudo et al., 1996) und klinischen (Liepert et al., 2000) Studien wurde der Einfluss des spezifischen Trainings, das die Voraussetzungen für eine optimale Rehabilitation liefert, auf die postischämische Plastizität untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass auch Jahre nach einem Hirninfarkt ein gezieltes Beüben von paretischen Extremitäten zu einer Reaktivierung und einer erhöhten Flexibilität bzw. Anpassungsfähigkeit von kortikalen und subkortikalen Strukturen führt. Die postischämische Plastizität beinhaltet eine Steigerung der Dendritendichte und Regeneration von Axonen (Chen et al., 2003) verbunden mit

der Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (Johansson, 2000). Dies führt zu einer Modulation der synaptischen Übertragung und des kortikalen Neurotransmittersystems (Nudo et al., 2001), was wiederum eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen intrakortikaler Exzitation und Inhibition zugunsten der exzitatorischen Aktivität nach sich zieht.

Die globale Beeinträchtigung des inhibitorischen Systems konnte in klinischen Studien verdeutlicht werden, die beim Schlaganfallpatienten einen Rückgang der Inhibition nachwiesen (Liepert et al., 2000). Auch in tierexperimentellen elektrophysiologischen Untersuchungen konnten ein bihemisphärischer Rückgang der Inhibition nach fokaler Ischämie beobachtet werden (Buchkremer-Ratzmann et al., 1996; Reinecke et al., 1999). Dieser steht mit einem Rückgang des inhibitorischen Transmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) in direktem Zusammenhang (Mittmann et al., 1994 und 1998; Neumann-Haefelin et al. 1995). Analog dazu konnte eine gesteigerte exzitatorische Aktivität in der Umgebung eines Infarkts nachgewiesen werden (Luhmann et al., 1995; Domann et al., 1993). Die Ergebnisse dieser verschiedenen Studien deuten auf eine Dysregulation des GABAergen Systems nach ischämischer Hirnläsion hin.

γ -Aminobuttersäure ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (Hevers und Luddens, 1998). In Abhängigkeit von der Hirnregion bildet sie in 20-50 % der inhibitorischen Synapsen des Gehirns den wesentlichen Transmitter (Bloom und Iversen, 1971) und vermittelt im Rückenmark die präsynaptische Hemmung. GABA wirkt zum einen indirekt mittels eines second messengers über einen metabotropen $GABA_B$ -Rezeptor. Dieser Rezeptor ist über GTP-bindendes Protein an K^+ - oder Ca^{2+} - Kanäle gekoppelt (Kaupmann et al., 1997). Zum anderen wirkt GABA direkt über einen ionotropen $GABA_A$ -Rezeptor. GABA führt in dieser Gruppe zu einer Konformationsänderung des $GABA_A$ -Rezeptors und damit zur Öffnung eines intrinsischen Ionenkanals. Aus dem Einstrom von Chlorid in die Zelle resultiert eine konsekutive Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran und ein Anstieg des inhibitorischen

Tonus (Whiting, 1999). In Ausnahmefällen können die Aktivierung des GABA_A-Rezeptors kortikaler Neurone und der Chlorid-Einstrom in die Zelle eine Depolarisation der postsynaptischen Membran nach sich ziehen (Wagner et al., 1997). Die GABA_A-Rezeptoren sind im gesamten kortikalen Netzwerk ubiquitär verteilt (Wisden et al., 1992; Laurie et al., 1992; De Blas, 1996) und spielen eine wichtige Rolle für die geregelte Funktion und Verschaltung der kortikalen und subkortikalen Strukturen (Hevers und Luddens, 1998). Das GABAerge System reguliert weite Teile des exzitatorischen Systems des Gehirns (Fritschy et al., 1999), die Modulation von Unruhe und Ängstlichkeit (Pratt, 1992), nimmt Einfluss auf das Ess- und Trinkverhalten (Cooper, 1989) und auf die zirkardiane Rhythmik (Turek und Van Reeth, 1988). Auf kognitiver Ebene ist es an der Modulation der Vigilanz, des Gedächtnisses und den Lernfähigkeiten beteiligt (Stephens et al., 1988). An diesem Punkt setzt die medikamentöse Therapie an, die bestrebt ist, die GABA-Wirkung durch Pharmaka, die am GABA_A-Rezeptor ansetzen, zu potenzieren. So wirken Benzodiazepine, Anästhetika, Barbiturate, Neurosteroidoide und auch Ethanol durch Aktivitätssteigerung des inhibitorischen Systems und entfalten auf diese Weise ihre anxiolytische, sedierende oder auch antikonvulsive Wirkung (Hevers und Luddens, 1998).

Der GABA_A-Rezeptor wird zu einer Familie von ligandenaktivierten Ionenkanälen gezählt, zu denen auch der nikotinerge Acetylcholinrezeptor, der strychnin-sensitive Glycinrezeptor und der 5-HT₃-Rezeptor zählen (Whiting, 1999). Diese Rezeptoren sind homooligomere oder heterooligomere Komplexe, die aus mehreren unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt sind und Ligandenbindungsstellen aufweisen (Hevers und Luddens, 1998) (Abb. 1A). Der GABA_A-Rezeptor ist ein aus fünf Untereinheiten zusammengesetztes Pentamer (Wisden und Seeburg, 1992). Es existiert eine GABA_A-Rezeptor-Gen-Familie mit unterschiedlichen Kombinationen verschiedener Klassen von Untereinheiten. Zur Zeit sind bis zu 20 verschiedene Untereinheiten bekannt: α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ϵ , θ , π und ρ 1-3 (Sieghart et al., 1999) (Abb. 1B). Dies ist der Grund für die Heterogenität

des GABA_A-Rezeptors. Neuere Forschungen zeigen, dass sich diese Rezeptoren in der Mehrheit aus bestimmten Kombinationen der verschiedenen Untereinheiten von α , β und γ zusammensetzten (Fritschy und Mohler, 1995). Es gibt Hinweise darauf, dass die γ -Untereinheit durch die δ -, ε -Untereinheiten ersetzt werden kann (Hevers und Luddens, 1998). Bezüglich der stöchiometrischen Anordnung existieren unterschiedliche Meinungen und Hypothesen. So wird von einigen Autoren postuliert, dass sich die fünf Untereinheiten auf $2 \times \alpha$, $1 \times \beta$ und $2 \times \gamma$ verteilen (Backus et al., 1993). In anderen Studien hingegen wird die Verteilung $2 \times \alpha$, $2 \times \beta$ und $1 \times \gamma$ beschrieben (Tretter et al., 1997), aber auch das gemeinsame Auftreten beider Kombinationen ist experimentell nachgewiesen worden (Whiting, 1999).

Durch Untersuchungen der m-RNA-Lokalisation der einzelnen Untereinheiten und durch zahlreiche immunhistochemische Methoden wurde gezeigt, dass es für jede Untereinheit ein spezifisches, regionell typisches Verteilungsmuster im Gehirn der erwachsenen Ratte gibt (Laurie et al., 1992; Wisden et al., 1992; Fritschy und Mohler, 1995). Dabei fällt auf, dass in funktionell unterschiedlichen Gehirnregionen, wie zum Beispiel im Bulbus olfaktorius, im Zerebellum oder in den hippocampalen Strukturen die einzelnen Rezeptoruntereinheiten in unterschiedlicher Dichte und prozentualer Zusammensetzung zueinander exprimiert sind (Gao und Fritschy, 1994). Diese Variabilität der Untereinheiten und die gleichzeitig auftretenden funktionellen Modifikationen sind ein deutliches Zeichen dafür, dass durch die Untereinheiten die spezifischen elektrophysiologischen und pharmakologischen Eigenschaften der Rezeptoren bestimmt werden und dass die Rezeptorfunktion durch die Zusammensetzung der Untereinheiten moduliert werden kann (Fritschy und Mohler, 1995). Die spezifischen Eigenschaften der einzelnen Untereinheiten sind noch weitgehend unerforscht. Nach einer fokalen Ischämie kommt es zu einer ausgedehnten bihemisphärischen Dysregulation der physiologischen zellulären Abläufe. Es kommt zu Sauerstoffmangel, Änderungen der metabolischen Aktivität, Hyperexzitabilität, einer erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -

Konzentration und Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Enzyme wie Stickstoffoxid-Synthase und verschiedenen Proteasen (Witte et al., 2000; Sharp et al., 2000).

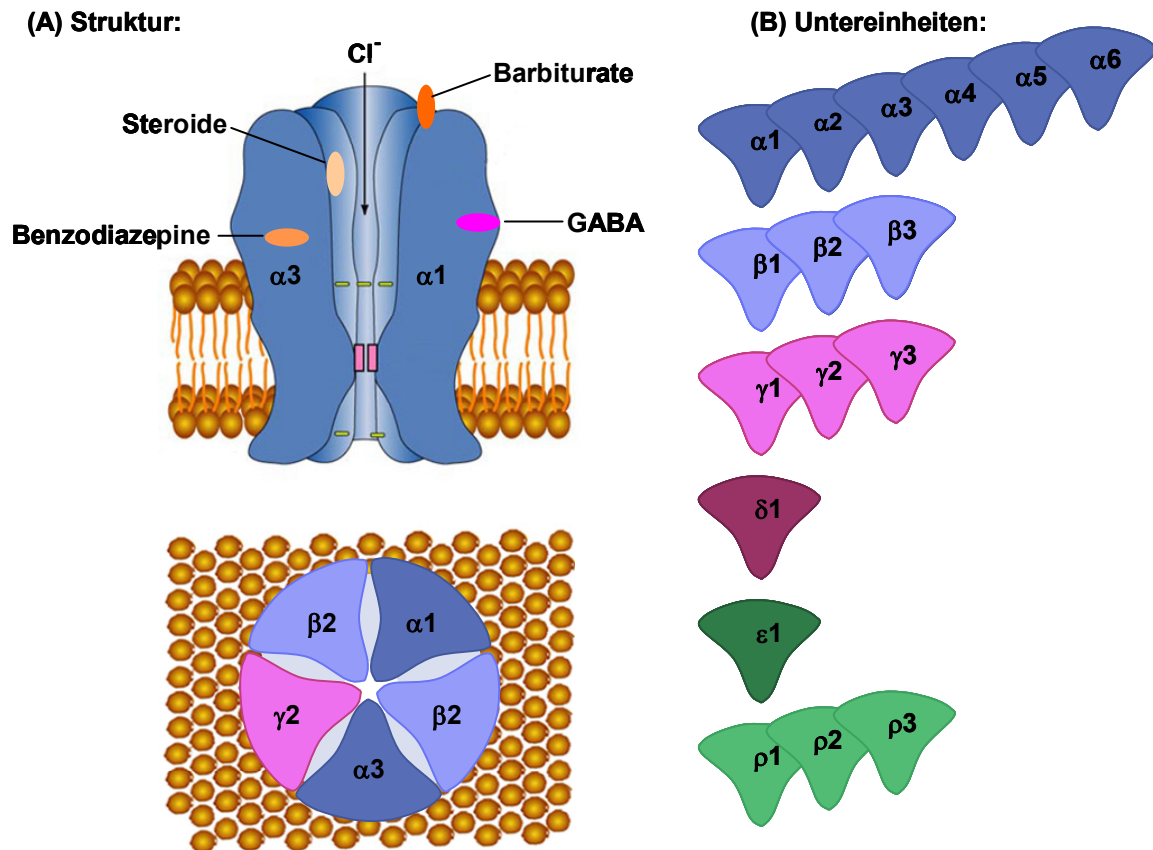


Abbildung 1: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors und seiner Untereinheiten. (A) Pentamerer Ionenkanal, zusammengesetzt aus unterschiedlichen Untereinheiten und Ligandenbindungsstellen für γ -Aminobuttersäure, Steroide, Benzodiazepine und Barbiturate. (B) Untereinheiten der GABA_A-Rezeptor-Gen-Familien, die in unterschiedlichen Kombinationen der verschiedenen Klassen von Untereinheiten den Hauptanteil der GABA_A-Rezeptoren formen: α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ und ρ 1-3.

Diese und andere funktionelle Änderungen bewirken ausgedehnte Modifikationen im GABAergen und glutamergen System, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition und im Endeffekt zu einer zerebralen Hyperexzitabilität führt. Die aktuelle Studie beschäftigt sich mit dysregulatorischen Prozessen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nach einer transienten fokalen Ischämie. Im Gegensatz zu vorausgegangenen Studien, die die Regulationsmechanismen nach einer fokalen permanenten Ischämie am Photo-

thrombosemodell (Redecker et al., 2002) untersucht haben, wurde eine transiente fokale Ischämie unterschiedlicher Dauer ausgelöst (30min bzw. 60min). Die fokale Ischämie wurde durch die transiente Okklusion der A. cerebri media (MCAO), mittels eines intraluminalen Filaments, induziert. Eine Rezirkulation erfolgt beim Menschen zum einen spontan, insbesondere wenn dem Infarkt ein embolisches Ereignis zugrunde liegt oder auch durch eine thrombolytische Therapie (Belayev et al., 1996). Das MCAO-Modell kommt demnach den pathophysiologischen Vorgängen beim Hirninfarkt nahe. Die spezifische Darstellung der Untereinheiten erfolgte mittels immunhistochemischen Färbemethoden sieben Tage nach einer transienten fokalen Ischämie. Da die Rezeptoreigenschaften zu einem großen Teil durch die α -Untereinheiten bestimmt werden, wurden vier α -Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$) und zusätzliche die $\gamma 2$ -Untereinheit als einzig ubiquitär vorkommende und rezeptorformende γ -Untereinheit (Wisden und Seeburg, 1992) untersucht.

3 Zielsetzung und Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nach transienter fokaler Ischämie bei der Ratte untersucht. Die fokale Ischämie wurde durch eine transiente Okklusion der A. cerebri media (MCAO) bewirkt. Mit der Expression der untersuchten Rezeptoruntereinheiten und den Auswirkungen auf die funktionellen und metabolischen Veränderungen beschäftigten sich im Vorfeld schon experimentelle Studien. Diese Studien nutzten zur Induktion der fokalen Ischämie das Photothrombose-Modell, das eine fokale Ischämie mit strukturellen Nekrosen des betroffenen Gewebes nach sich zieht. Der Vergleich der Ergebnisse aus der aktuellen Studie mit den Ergebnissen der Studie von Redecker et al. 2002 kann es ermöglichen, eine Aussage darüber zu treffen, ob die Veränderungen unabhängig vom Induktions-Modell der Läsion gleichsinnig sind und so in erster Linie auf das Ischämieereignis zurückzuführen sind.

Das MCAO-Modell, das in der vorliegenden Studie verwendet wurde erlaubt es, die Ischämiezeit zu variieren (30 min bzw. 60 min) und so die bihemisphärischen Veränderungen der Dichte der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ nach transienter Ischämie auch im zeitlichen Verlauf zu untersuchen. Hieraus ergaben sich die weiteren Ziele dieser Arbeit: Zum einen sollte untersucht werden in welcher Form sich eine variierende Ischämiezeit von 30 min bei der ersten Versuchsgruppe und von 60 min bei der zweiten Versuchsgruppe auf die bihemisphärisch dysregulatorischen Prozesse der einzelnen kortikalen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten auswirken. Zum anderen sollten eventuelle Veränderungen der Untereinheiten-Dichte topographisch und im Zeitverlauf nach Induktion einer Ischämie charakterisiert und im Bezug auf funktionell relevante Vorbefunde analysiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Versuchstiere

Die Studie wurde an 26 adulten, männlichen Wistar-Ratten durchgeführt, die Körpergewichte von 220 g bis 380 g aufwiesen. Sie wurden im Institut für Versuchstierkunde, Jena, gezüchtet und wuchsen unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Haltungsbedingungen auf. Die SPF-Haltung geschah bei konstanten Bedingungen und einer Raumtemperatur von 21-23 °C. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 40-60 %. Der Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden Helligkeit und 12 Stunden Dunkelheit wurde mit künstlichem Licht herbeigeführt. Die Tiere hatten freien Zugang zu pelletiertem Trockenfutter und angesäuertem Wasser (pH 2.5-3.5), um die Keimbildung in den Trinkflaschen zu vermeiden.

4.2 Induktion fokaler Ischämien

Die transiente Okklusion der A. cerebri media (MCAO) ist eine weit verbreitete Methode, um im Tiermodell pathophysiologische Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie zu untersuchen. Die Induktion fokaler Ischämien durch MCAO beruht auf einer Technik, die von Koizumi (Koizumi et al., 1986) und Zea Longa (Longa et al., 1989) beschrieben wurden. Hierbei wird durch Einführen und Verschieben eines Fadens durch die rechte A. carotis communis (CCA) und die rechte A. carotis interna (ICA) der Blutfluss in der A. cerebri media (MCA) unterbrochen und somit eine fokale Ischämie induziert.

Diese Methode bietet die Möglichkeit, den Faden nach Ablauf einer definierten Ischämiezeit zurückzuziehen und so eine Reperfusion einzuleiten. In den vorliegenden Untersuchungen wurden zwei Gruppen von Tieren mit unterschiedlichen Ischämiezeiten untersucht: 7 Tiere mit 30 Minuten und 5 Tiere mit 60 Minuten. Als Kontrollen dienten 8 Tiere, die der gleichen Operation unterzogen wurden, ohne dass jedoch ein Faden eingeführt wurde.

4.2.1 Das intraluminale Filament

Als Grundmaterialien dienten 4/0 Polyamidfäden (Sutopak, Ethikon; Ethikon), die auf eine Ausgangslänge von 30-40 mm zugeschnitten wurden. Das eine Ende wurde mit Schleifpapier abgerundet. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit Aceton, um den sauberen Faden anschließend durch Eintauchen in ein Silikonmedium (Provil L., Heraeus-Kulzer) zu überziehen. Der Faden erhielt durch diesen Prozess eine nach vorne ausdünnende, konische Form. Nach Abbinden des Mediums wurde der Faden auf seine Endlänge von 25 mm gekürzt.

4.2.2 Anästhesie und Temperaturkontrolle

Die MCAO wurde unter Vollnarkose durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Glaszylinder, in den ein Gasgemisch aus 3.5 % Enfluran, 40 % Lachgas (N_2O) und 20 % Sauerstoff (O_2) eingeleitet wurde. Nach 2 Minuten wurde die Konzentration des Enflurans auf 2-2.5 % gesenkt. Dieser konstante Enflurananteil wurde für die Zeit der Operation beibehalten und über eine Inhalationsmaske zugeführt.

Nach einer weiteren Minute wurde das Tier aus dem Glaszylinder genommen und in Rückenlage auf den mit einer Heizmatte versehenen Operationstisch gelegt. Die Fixation des Tieres erfolgte an den Hinterbeinen. Die Temperatur wurde über ein rektales Thermometer kontinuierlich kontrolliert und mit Hilfe einer Heizmatte auf 36.5 °C konstant gehalten.

Zur Narkoseausleitung wurde der Enflurananteil allmählich gesenkt und der Anteil des reinen Sauerstoffs erhöht. Die Tiere wurden bis zum vollständigen Erwachen beobachtet und dann in den Käfig zurückgesetzt.

4.2.3 Operation

Der Kopf des Tieres wurde etwas überstreckt, das Halsfell desinfiziert und rasiert. Durch einen medialen Halsschnitt wurde der Zugang zu den oberflächlichen Strukturen des Halses geschaffen. Sowohl durch den Thymus als auch durch die ventral der Trachea gelegenen Halsmuskulatur, die sich nach weiterer stumpfer Präparation darstellte, wurde ein Faden gezogen. Der Thymus wurde mit einer

Fadenschlinge rechtsseitig, die Muskulatur linksseitig fixiert. In dem entstandenen Fenster konnte auf der rechten Seite der Abschnitt der A. carotis communis dargestellt werden, in dem sie sich in die A. carotis interna und die A. carotis externa teilt. Die A. carotis communis verläuft in der Gefäß-Nerven-Strasse des Halses medial und parallel zum N. vagus, von dem das Gefäß präparativ getrennt wurde.

Im Verlauf der A. carotis communis wurden zwei Seidenfäden angelegt. Mit dem ersten wurde die Arterie 7 mm proximal ihrer Gabelung ligiert. Der zweite wurde 4 mm distal des ersten Fadens als lose Schlinge um das Gefäß gelegt. Es folgte ein weiterer Präparationsschritt, in welchem die A. carotis interna und die A. carotis externa, bis zur A. occipitalis, einem Hauptast der A. carotis externa, freigelegt wurden.

Im weiteren Verlauf wurde das Einführen des intraluminalen Filaments vorbereitet. Die A. carotis externa wurde ligiert, um einen kolateralen Blutfluss in die A. occipitalis zu unterbinden. Die Durchblutung der A. carotis interna wurde mit einem atraumatischen Mikroclip (Codman) an deren Abgang kurzzeitig unterbrochen.

Das Okklusionsfilament wurde 4 mm proximal der Teilungsstelle in die A. carotis communis eingeführt, nachdem diese mit einer Augenschere eröffnet worden war. Nachdem der Faden die Höhe des Mikroclips erreicht hatte, wurde dieser entfernt. Danach wurde der Faden weitere 16-17,5 mm im Verlauf der A. carotis interna geschoben, bis ein federnder Widerstand spürbar wurde. Damit entsprach die Lage der Filamentspitze dem Anfang der A. cerebri anterior, deren dünneres Lumen für den Widerstand verantwortlich war (Longa et al., 1989). Gleichzeitig unterband dadurch die Filamentspitze die Blutzufuhr der A. cerebri media aus der A. cerebri inferior, der A. cerebri anterior und der A. cerebri posterior. Zur Kontrolle der richtigen Lage wurde der Abstand von Fadenanfang bis Mitte der Bifurkation gemessen, der 8 mm betrug. Die zu Beginn angelegte Fadenschlinge

die frei präparierte A. carotis communis wurde proximal der Gabelung eine Fadenschlinge gelegt. Die Ischämie wurde durch Entfernen des Filaments 30 min bzw. 60 min nach Okklusionsbeginn aufgehoben, nachdem die Fixierungsschlinge entfernt worden war.

Das Zurückziehen des Filaments birgt die Gefahr eines Blutrückstroms und damit einer Verlängerung der Ischämiezeit. Um dies zu vermeiden wurde die zuletzt angelegte Fadenschlinge zugezogen, Die Halswunde wurde wieder verschlossen, die Narkose ausgeleitet und das Tier zurück in den Käfig gesetzt.

An den Kontrolltieren wurde eine Scheinoperation durchgeführt, die der oben beschriebenen entsprach. Es wurde jedoch kein Okklusionsfilament eingeführt und damit auch keine Ischämie hervorgerufen.

4.3 Gewebegewinnung

4.3.1 Perfusionslösungen

Spüllösung: 0.1 M phosphatgepufferte Normalsalzlösung, pH 7.4 (PBS): Der Ansatz erfolgte unter Verwendung von 1800 ml Aqua dest. als Puffer, 165 ml Base und 35 ml Säure.

Säure: 13.799 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 79.478 g NaCl, 100 ml Aqua dest.

Base: 42.88 g Na_2HPO_4 anhydriert, 238.435 g NaCl, 3000 ml Aqua dest.

Fixationslösung: 40 g Paraformaldehyd, das bei 60 °C in 300 ml Aqua dest. gelöst wurde, 500 ml 0.15 M Phosphatpuffer (PB) (pH 7.4), 150 ml Prikinsäure (gesättigt), 200 µl einer 25 %igen Glutaraldehydlösung (PFA) und 1000 ml Aqua dest. (Fritschy und Mohler, 1995)

Phosphatpuffer (PB): 28.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 800 ml Aqua dest., 8.3 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 300 ml Aqua dest. (Somogyi und Takagi, 1982).

4.3.2 Transkardiale Perfusion

Die Tiere wurden 7 Tage nach der MCAO transkardial perfundiert. Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Glaszylinder, auf dessen Boden ein mit Äther

versetzter Zellstoff lag und in den ein Lachgas-Sauerstoffgemisch im Verhältnis 7:3 zugeführt wurde. Zur fortlaufenden Betäubung wurde dem Tier anschließend eine Tube auf die Nase gesetzt, in der sich ebenfalls in Äther getränkter Zellstoff befand. Nach Eintreten der tiefen Narkose, wurde das Tier auf dem Rücken liegend in einer Plastikschiene an den Extremitäten fixiert und durch einen medialen Abdominalschnitt bis zum Sternum eröffnet. Dies ermöglichte den Zugang zum Zwerchfell und zur Unterseite der Rippen. Diese wurden im Sternumverlauf, von unten nach oben, voneinander getrennt, um den Thorax, nach Durchschneiden des Zwerchfells, aufzuklappen. Bruststamm und Herz wurden freipräpariert, bis die Herzventrikel mit einer chirurgischen Klemme zu fassen waren und das Herz so an den Ventrikeln fixiert werden konnte. Am linken Ventrikel wurde mittels eines Skalpells eine Öffnung geschaffen, die es ermöglichte, eine Sonde durch die Herzspitze einzuführen. Der Katheter wurde bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Auch der rechte Vorhof wurde punktiert, um den Abfluss der Lösungen aus dem großen Kreislauf zu gewährleisten.

An den Katheter wurde eine Perfusionspumpe (505S, Watson-Marlow) angeschlossen, über die zunächst mit 45 ml Spüllösung (2 min), das verbliebene Blut vor dem Fixieren aus dem Gefäßsystem ausgewaschen wurde. Anschließend wurden zur Vorfixation der Gehirne während der Perfusion 300 ml Fixationslösung (10 min) eingespült. Beide Lösungen wurden bei 4 °C verwendet.

Nach Ablauf der Perfusionszeit wurde das Tier sofort mit einer Schere dekapitiert, der Schädel und die Dura mater mit verschiedenen Pinzetten eröffnet. Das Gehirn wurde freipräpariert und ohne Schäden entnommen, um dann in 50 ml Fixationslösung (PFA) für 12-15 Stunden inkubiert zu werden.

4.3.3 Inkubation und Einfrieren der Gehirne

Um Gefrierschäden zu vermeiden, wurden die Gehirne in Saccharoselösung gelegt. Dazu wurde Saccharose in 0.1 M PBS gelöst. Die Inkubation erfolgte zunächst für 3-12 h in 50 ml 10 % iger, dann für 24-48 h in 50 ml 30 % iger Lösung.

Zur Orientierung diente das Absinken der Gehirne im Medium. Beim Einsetzen in das gefüllte Kunststoffröhrchen (Falcon) blieben sie an der Oberfläche liegen und sanken allmählich nach unten ab. Mit dem Umsetzen in die höherprozentige Lösung wurde bei Bodenberührung begonnen.

Zur weiteren Lagerung wurden die Organe tiefgekühlt. Da Temperaturen unter -30°C beim Schockgefrieren wegen irreparablen Gefrierartefakten zu vermeiden sind, erfolgte das Einfrieren zweistufig: Zunächst wurde mit Hilfe von Trockeneis 2-Methylbutan auf -30°C gekühlt und das Gehirn darin für 30-40 Sekunden eingefroren. Danach wurden die Gehirne in einem Tiefkühlschrank bei -70°C bis zur Weiterverarbeitung eingelagert.

4.4 Färbemethoden

4.4.1 Herstellung der Schnitte

Die Gehirne wurden vor dem Schneiden spezifisch vorbehandelt, um die Nachweisbarkeit der GABA_A -Rezeptorproteine, bei der immunhistochemischen Färbung zu verbessern (Bohlhalter et al., 1996; Fritschy et al., 1998). Sie wurden dazu über 12-15 h bei Raumtemperatur in 0.1 M Citratpuffer (pH 4.5) inkubiert und anschließend mit 80 ml desselben Puffers durch Mikrowellen (135 s bei 650 W) erhitzt.

Mit einem Skalpell wurde ein Teil des vorderen Hirnpols, der Hirnstamm, das Zerebellum und Teile des Occipitallappens abgetrennt. Es entstand so ein Hirnblock mit eröffnetem Ventrikelsystem. Vor dem Schneiden wurden, anhand eines Anatomieatlasses für Rattengehirne (Zilles, 1992) drei koronare Schnittebenen festgelegt, die die Versorgungsareale der A. cerebri media repräsentierten (Bregma -1 mm bis -1.33 mm, Bregma -2 mm bis -2.3 mm, Bregma -2.6 mm bis -2.9 mm). Jeweils sieben Schnitte wurden weiterverarbeitet. Der erste wurde nach Nissl mit Kresylviolett, der zweite immunhistochemisch mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker neuronal nuclei antigen (NeuN) gefärbt. Die fünf übrigen

Schnitte wurden für den immunhistochemischen Nachweis der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\gamma 2$) verwendet.

Die Hirnschnitte wurden mit einem Gefrierschnittmikrotom (Mikroton HM 400, Heidelberg) angefertigt. Die Schnittdicke betrug 60 μm . Die Temperatur beim Schneiden betrug -20°C bis -30°C . Nach dem Schneiden wurden die Schnitte mit einem feinen Pinsel in kalten 0.1 M PBS gelegt.

4.4.2 Färbemedien

Phosphatpuffer (PBS): 17.5 ml Säure mit 500 ml Aqua dest. Das Gemisch wurde mit Base auf pH 7.4 titriert und dann mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Säure: 13.799g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 79.478g NaCl 1l H_2O

Base: 28.392g Na_2HPO_4 , 158.957g NaCl, 1l H_2O

Kresylviolett Färbelösung: 300 ml Aqua dest., 1.6326 g Na-Acetat wasserfrei, 2.88 ml Essigsäure, 100 mg Kresylviolett. Der pulverförmige Farbstoff Kresylviolett wurde im Vorfeld bei 60°C vollständig aufgelöst und anschließend filtriert.

Tris-Triton: Die Stocklösung bestand aus 0.5 M Tris (60.55 g/l Aqua dest.) und 1.5 M NaCl (73.80 g/l Aqua dest.). Diese wurde 1:10 mit HCL auf pH 7.4 bzw. pH 7.7 titriert und dann 0.05 % TritonX zugegeben.

Primäre Antikörperlösung: Primärer Antikörper vom Meerschweinchen (Fritschy, Institut für Pharmakologie, Universität Zürich), bzw. der Maus für NeuN-Färbung. Der Antikörper wird mit 32 ml Tris-Triton (pH 7.4) und 640 μl normalem Ziegen Serum (normal goat serum (NGS), Dianova, Hamburg) im Verhältnis 1:50 angesetzt.

Sekundäre Antikörperlösung: Biotinylierter sekundärer Ziegen-Antikörper.

Die Lösung, mit der die GABA_A- Rezeptoruntereinheiten gefärbt wurden, setzt sich zusammen aus 19 ml Tris-Triton (pH 7.4), 380 μl NGS und 63.3 μl biotinyliertem Ziege-anti-Meerschwein-Antikörper (Jackson, Immuno Research, West Grove, PA) in der Verdünnung 1:300.

Die Lösung zur NeuN-Färbung enthielt 4 ml Tris-Triton, 80 µl NGS und 13.3 µl biotinylierter Ziege-anti-Maus-Antikörper im Verhältnis 1:300.

Avidin-Biotin-Reagenz: 22 ml Tris-Triton (pH 7.4), 220 µl gelöstes Avidin und 220 µl gelöste biotinylierte Peroxidase.

Diaminobenzidinhydrochlorid (DAB): 200 ml Tris-Triton pH 7.7 und 2.0 ml DAB.
Man erhält eine auf 0.025 % verdünnte Lösung.

4.4.3 Kresylviolett-färbung nach Nissl

Die frischen Gefrierschnitte wurden 6-15 min in PBS gespült und dann mit Gelatine auf einen Objektträger aufgezogen. Nachdem die Färbelösung auf 60-70 °C erhitzt worden war, wurden die Schnitte in dieser 10 min gefärbt und dann zum Eindeckeln vorbereitet.

4.4.4 Immunhistochemische Färbungen

Es wurde nach der Avidin-Biotin-Methode gefärbt (Beesley et al., 1993), welche auf der Grundlage der indirekten Enzymhistologie beruht. Hierbei werden die Schnitte zuerst in einem spezifischen, unmarkierten Antikörper inkubiert. Gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe werden dann mit einem sekundären Anti-Antikörper gekoppelt, der sich mit seinem F_{ab} -Fragment gegen die Epitope des F_{ac} -Fragments des primären Antikörpers richtet, während ihm mit seinem freien F_{ac} -Fragment eine weitere Bindungsstelle für Enzyme zur Verfügung steht.

Das Vitamin Biotin (244 Dalton) wird mit sehr hoher Affinität durch Avidin (68 Dalton), einem basischen Glykoprotein, gebunden (Hsu und Ree, 1980). Verschiedene an Avidin gekoppelte Enzyme ermöglichen so verschiedene Färbereaktionen. An Gewebeschnitten kann die Reaktion verstärkt werden, indem man vorgeformte Biotin-Avidin-Peroxidase-Komplexe dazu gibt, die an die biotinkoppelten Antikörper binden (F. Kayser, 1998). Die Vernetzung des Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexes (Vectastain Elitekit, Vectastain Laboratories, Burlingame, CA) erfolgte durch „Aktivierung“ im Avidin-Biotin-Reagenz. Am entstandenen Komplex findet die Färbereaktion durch DAB-Wasserstoff-Peroxid-Gemisches als Chromogen und 0.006% H_2O_2 als Redoxmittel statt.

Färbung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten

Die GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\gamma 2$ wurden unter Verwendung polyklonaler speziesspezifischer primärer Antikörper gefärbt. Diese Antikörper wurden in Meerschweinchen kultiviert, indem ihnen synthetisch hergestellte Peptidsequenzen der cDNA der Untereinheiten injiziert worden waren. Die cDNA der jeweiligen Untereinheiten war zuvor aus Ratten isoliert worden (Fritschy und Mohler, 1995; Fritschy et al., 1998).

Die frei flottierenden Hirnschnitte wurden in Kunststoffschälchen gelegt, dreimal mit 0.2 M Tris-Puffer (pH 7.4) mit Triton gewaschen und anschließend faltenfrei in den Vorinkubationspuffer gelegt. Tris-Triton erleichtert durch Aufbrechen der Zellmembranen die Antikörperbindung. Die Verdünnungen des primären Antikörpers wurden entsprechend der Affinität der Untereinheiten angesetzt: $\alpha 1$: 1:20.000, $\alpha 2$: 1:2.000, $\alpha 3$: 1:2.000, $\alpha 5$: 1:4.000, $\gamma 2$: 1:2.000. Die Schnitte wurden für 12-15 h in einer feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Vor der Weiterverarbeitung wurden sie wiederum dreimal in Tris-Triton (pH 7.4) gewaschen. Zur Bindung des biotinylierten sekundären Antikörpers wurden sie 30 min bei Raumtemperatur in den Inkubationspuffer gelegt. Um die Vernetzung der Avidinmoleküle mit den biotinylierten Peroxidaseenzymen zu ermöglichen, wurde der Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex 30 min vor der Verarbeitung angesetzt. Die Schnitte wurden dreimal 10 min gewaschen, dann 30 min im AB-Reagenz inkubiert und erneut in Tris-Triton (pH 7.4) gewaschen.

Es folgte die abschließende DAB-Reaktion: Zunächst wurden sie mit 2 ml DAB fünf Minuten inkubiert. Durch Zusetzen des DAB-Wasserstoff-Peroxid-Gemisches und H₂O₂ (2 ml/Well) wurde die Färbereaktion ausgelöst. Färbeartefakte können durch Faltenbildung bzw. Übereinanderliegen von Schnitten entstehen. Dies wurde durch vorsichtiges Rühren mit einem Pinsel verhindert. Die Reaktionszeit betrug 5-10 min. Um die Reaktion zu stoppen, mussten die Schnitte in kaltes PBS gebracht werden. Sie wurden noch zweimal 30 min in PBS gespült und konnten dann auf den Objektträger aufgezogen werden.

NeuN-Färbung:

Die NeuN-Färbung entspricht in ihrem Ablauf der Färbung der GABA_A-Untereinheiten. Im Unterschied zu der oben beschriebenen Färbung wurden hier als primäre Antikörper in Mäusen kultivierte Antiseren, im Verhältnis 1:1000 eingesetzt und als sekundäre Antikörper biotinylierte Ziege-anti-Maus-Antikörper verwendet.

4.4.5 Aufziehen und Eindeckeln der Schnitte

Die Schnitte wurden nacheinander mit dem am weitesten vorne liegenden Schnitt beginnend mit Gelatine auf die Objektträger aufgezogen und an der Luft getrocknet. Zum Entwässern der Schnitte wurden die Objektträger durch eine Isopropanolreihe geführt, indem sie nacheinander 3-4 min in Isopropanol verschiedener Konzentrationen gelegt wurden: zweimal in 70 %igem (140 ml Isopropanol, 60 ml Aqua dest.), zweimal 96 %igem (192 ml Isopropanol, 80 ml Aqua dest.) und zweimal in 100 %igem. Bis zum Eindeckeln der Schnitte wurden sie in Xylol gelegt. Zuletzt wurden sie mit 2-3 Tropfen Toluol (Entellan; Merck, Darmstadt) beträufelt und das Deckglas blasenfrei aufgebracht.

4.5 Analyse der morphologischen und immunhistochemischen Daten

4.5.1 Messungen und lichtmikroskopische Auswertung

Die NeuN und Kresylviolett-Schnitte wurden mit einer digitalen Kamera (Zeiss AxioCam, Jena) aufgenommen und mit einem Imaging-Programm (Zeiss AxioVision 2.05) bearbeitet.

Zur semiquantitativen Analyse der Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte digitalisiert und farbkodiert dargestellt. Die Farbkodierung repräsentiert die Helligkeitsunterschiede durch Wandlung von Graustufen in Farben und erleichtert das Erkennen der regionalen Expressionsmuster. Sie ist diesbezüglich der Lichtmikroskopie überlegen (Abb. 3).

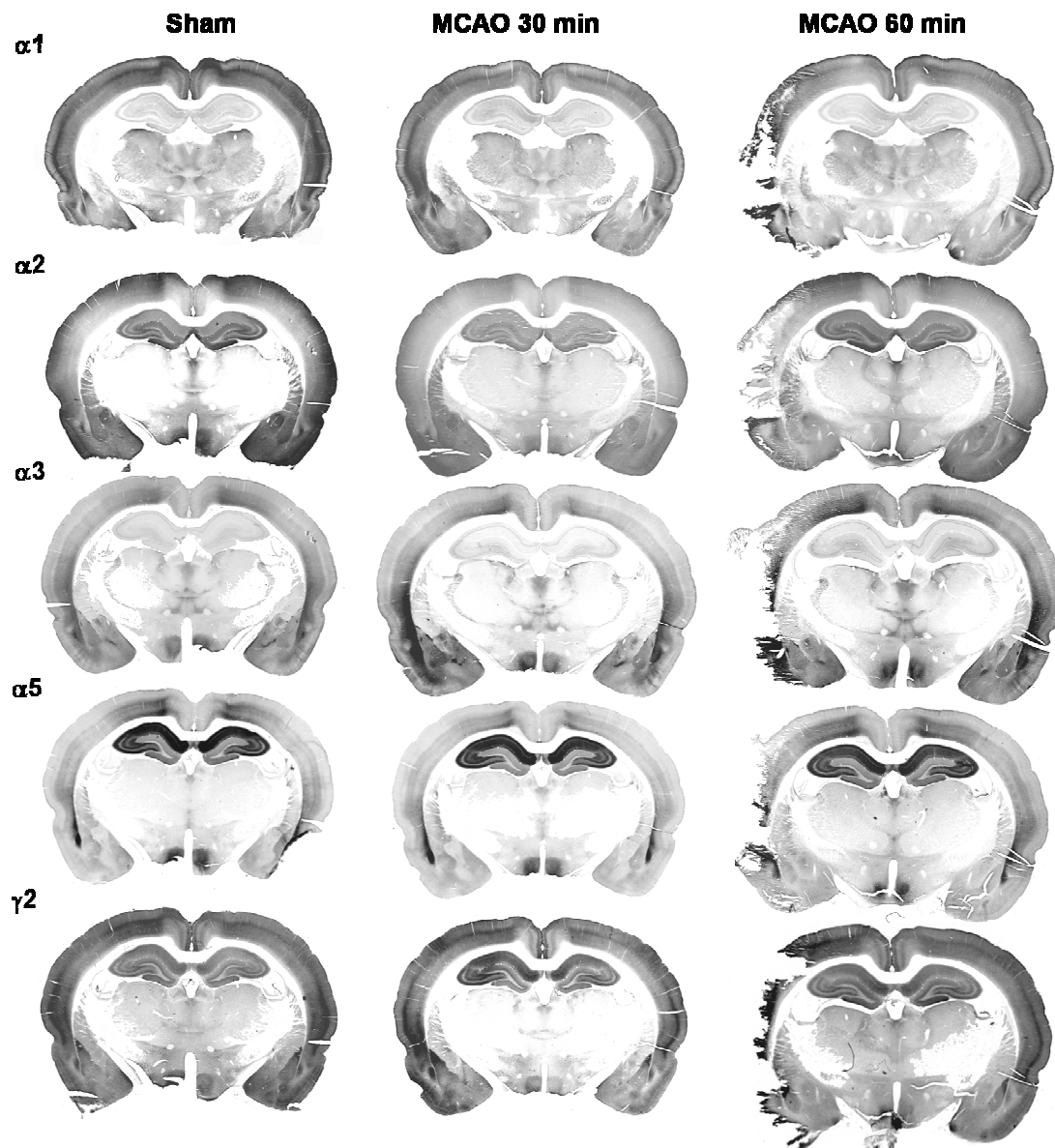


Abbildung 3: Lichtmikroskopisch erfassbare Verteilung der Dichte der GABA_A-Rezeptor- Untereinheiten nach immunhistochemischer Reaktion mittels Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode. Es werden sowohl die Sham- operierten Kontrollen als auch die Schnitte der Tiere nach 30 bzw. 60 minütiger Okklusionszeit gezeigt.

Die Digitalisierung ermöglicht darüber hinaus die Bestimmung der optischen Dichten der Immunreaktivität. Dazu wurden die Schnitte auf einen helligkeitsstabilisierenden Beleuchtungstisch (Imaging Research Inc.; Model B90) gelegt und mit einer CCD-Kamera (Mandi, Y 9220) einzeln eingelesen. Das analoge Signal der CCD-Kamera wurde über einen Video-Prozessor (Hamamatsu, DVS-3000) nachverstärkt und anschließend digitalisiert. Die farbkodierte Darstellung erfolgte mit dem Imaging-Programm (NIH-Image) (Abb. 4).

An jeweils zwei Schnitten eines jeden Tieres wurden Messungen der relativen optischen Dichte (ROD) der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten durchgeführt. Folgende cytoarchitektonische Strukturen wurden mit Hilfe eines Anatomie-atlasses für Rattengehirne (Zilles, 1992), in beiden Hemisphären festgelegt und analysiert: der primär motorische Kortex (frontal cortex, FR), der Hinterpfoten repräsentierende Kortex (hindlimb representation cortex, HL), der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex (Par1, Par2), die Hippokampusformation, der Thalamus, das Striatum (Nucleus caudatus und Putamen) und das Infarkt-areal. Anhand der kresylviolett gefärbten Schnitte war es möglich diese kortikalen und subkortikalen Abschnitte festzulegen. Das Corpus callosum wurde repräsentativ für den Hintergrund gemessen, um im späteren Verlauf der Auswertung eine Subtraktion des Hintergrundes durchführen zu können. Die Auswertung geschah anhand einer Graustufen-Skala, die mit 256 Farben farbkodiert war (Abb.4).

4.5.2 Statistische Auswertung

Die Messwerte wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm überführt (Microsoft Excel). Hier wurden die relativen optischen Dichten der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten, der ipsi- und kontralateralen Seite des Infarkts bei den Ischämie-Tieren (X_1) mit denen der Kontrolltieren (X_2) verglichen. Die statistische Auswertung und die Wahl der Testmethode stützte sich auf einen ungepaarten t-Test ($p < 0.05$), in dem die optischen Dichten als Mittelwert \pm Standardabweichung die Auswertungsgrundlage darstellten, solange dies im Folgenden nicht anderweitig definiert wird. Diese Auswertungsmethode wurde durch den Signifikanztest nach Holm ($\alpha = 0.1$), der als Weiterführung der Bonferroni-Methode (Holm, 1979) gilt, ergänzt.

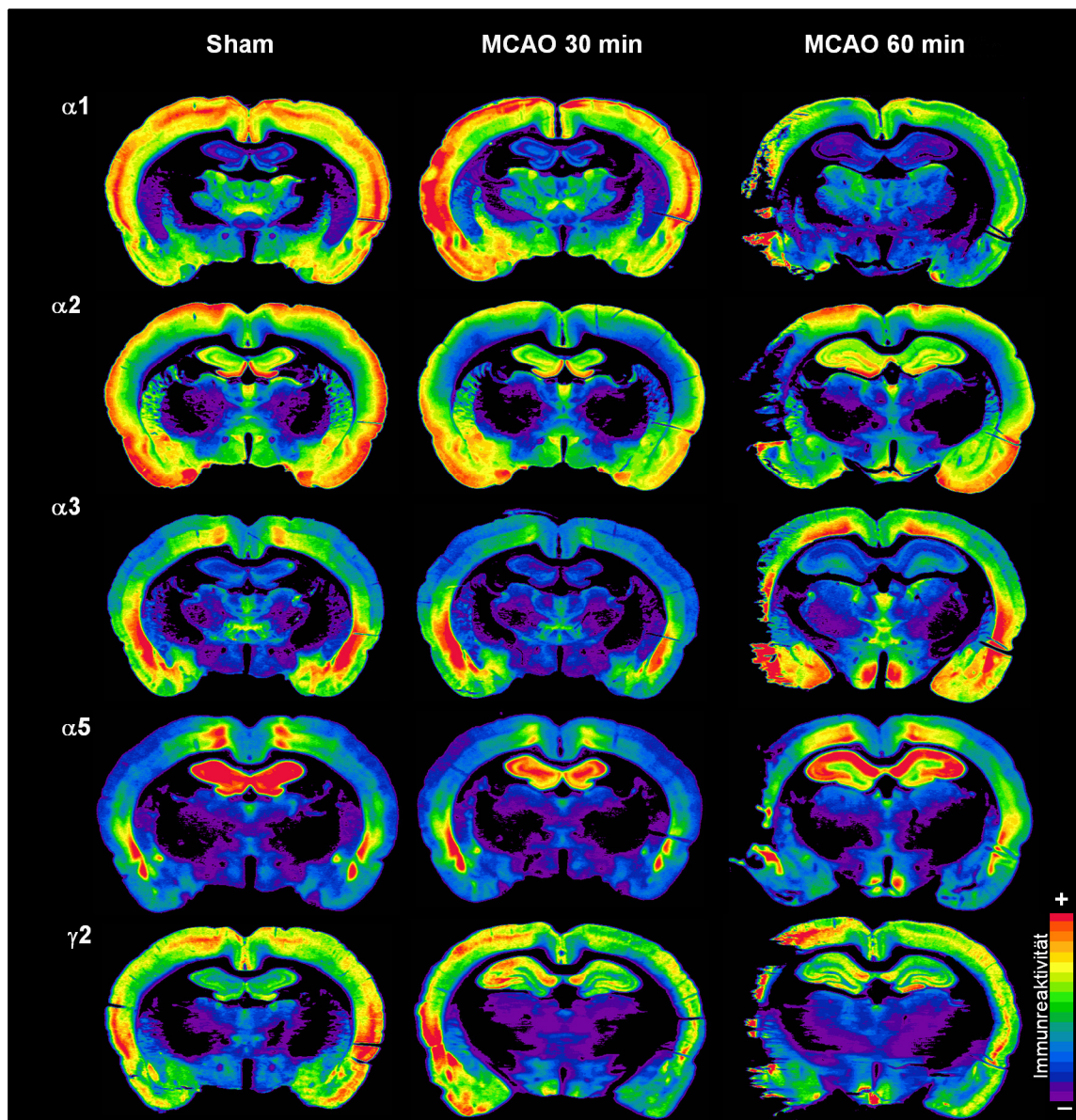


Abbildung 4: Farbodierte Darstellung der Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ bei sham-operierten Ratten und nach MCAO mit unterschiedlichen Ischämiezeiten. Für jede Untereinheit wird die optische Dichte der Immunreaktion unter Verwendung einer Standard 256-Farbstufen-Skala farbodierte dargestellt. Diese ist von schwarz für den Hintergrund, über violett, blau, grün, gelb und rot für die intensivsten Signale abgestuft. Die Schnitte der Sham-operierten Tiere zeigen das typische Verteilungsmuster der Untereinheiten im Gehirn der erwachsenen Ratte mit symmetrischen Intensitäten in beiden Hemisphären, während die Tiere nach einer MCAO zu einem kleinen subkortikalen Infarkt (MCAO 30 min), zu einem großen kortikalen und subkortikalen Infarkt (MCAO 60 min) und bihemisphärischen Dysregulationen aufweisen.

5 Ergebnisse

5.1 Morphologie der Infarkte nach MCAO

Die strukturellen Veränderungen einer linksseitigen temporären MCAO wurden an 12 Ratten untersucht, deren Gewicht $300\text{ g} \pm 80\text{ g}$ betrug und keinen Veränderungen während des Untersuchungszeitraums unterlag. Die zu charakterisierenden Gruppen waren durch Ischämiezeiten von 30 min ($n = 7$) und 60 min ($n = 5$) definiert und wurden mit Hilfe histologischer Standardtechniken (Kresylviolettfröbung) lichtmikroskopisch beurteilt. Die Gehirnschnitte der Tiere, die einer fokalen zerebralen Ischämie unterzogen worden waren, wurden mit einer Kontrollgruppe ($n = 8$), die scheinoperiert war, verglichen. Die zu vergleichenden koronaren Schnittebenen wurden so gewählt, dass die durch Ischämie in der A. cerebri media beeinflussten Abschnitte der Hemisphären repräsentiert wurden (Bregma -2 mm bis -2.3 mm, Bregma -2.6 mm bis -2.9 mm) (Abb. 5 A/B).

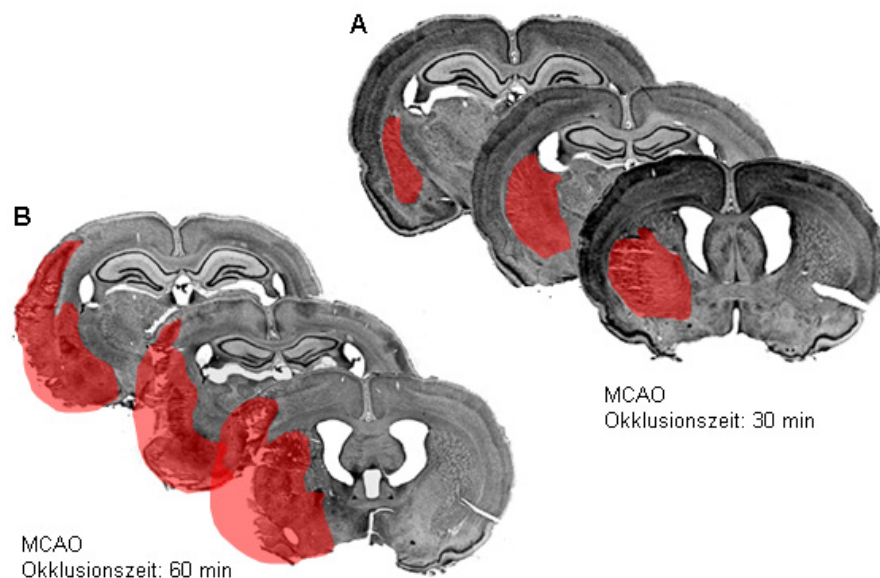


Abbildung 5: Morphologie der Infarkte nach linksseitiger MCAO bezogen auf die repräsentativen koronaren Schnittebenen. Die Hirnschnitte wurden mit Antikörpern gegen den neuronalen Marker NeuN (neuronal nuclear antigen) gefärbt, was die Darstellung aller intakten koronaren Schichten ermöglicht. (A) Lichtmikroskopisch nachweisbare subkortikale Strukturverluste nach einer Okklusionszeit von 30min. (B) Großer Infarkt der linken Hemisphäre mit kortikalen und subkortikalen Strukturverlusten nach einer Okklusionszeit von 60min.

Die Kontrolltiere wiesen sowohl im Neokortex als auch subkortikal keine strukturellen Veränderungen auf. In der Gruppe der Tiere mit 30 Minuten Ischämiezeit waren im Kortex keine Veränderungen zu beobachten. Es waren jedoch bei 71% der untersuchten Schnitte sichtbare strukturelle Veränderungen in den subkortikalen Strukturen zu erkennen. Die Tiere mit langen Ischämiezeiten von 60 min zeigten zu 100% einen ausgeprägten strukturellen Infarkt der linken Hemisphäre. Dieser stellte sich als großes nekrotisches Areal dar, das alle Kortexschichten in den folgenden Kortexregionen einschloss: mediale Anteile des primären somatosensiblen Kortex (Par1 nach Zilles et al., 1985) und des sekundären somatosensiblen Kortex (Par2). In der subkortikalen Region blieben das Corpus callosum, der Hippokampus und der Thalamus weitgehend unbeschädigt. Das Striatum war als direkt an den Kortex angrenzende Struktur teilweise oder vollständig zerstört. Die immunhistochemische Anfärbung der Neurone (NeuN-Färbung) ermöglicht die Visualisierung eines Nervenzellverlustes und eines möglichen Ödems in der Infarktumgebung. Die Zelldichte, die kortikale Laminierung und die Kortexdicke blieben bei den Tieren mit Ischämieende nach 30 min im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert. Nach 60 minütiger Durchblutungsunterbrechung war ein solcher Vergleich aufgrund des Substanzverlustes hinfällig. Auch in den subkortikalen Strukturen waren weder nach 30 min noch nach 60 min Ischämie diesbezügliche Veränderungen zu erkennen.

5.2 Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$

Die Expressionsmuster der verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\gamma 2$) wurden anhand der farbkodierten Bilder analysiert, die im direkten Vergleich mit den originalen immunhistochemischen Bildern standen (Abb. 6; Abb. 9; Abb. 11).

5.2.1 Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Gehirn der erwachsenen Ratte (Kontrollgruppe)

Die immunhistochemischen Färbungen der Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ zeigten bei allen Kontrolltieren ($n = 8$) ein spezifisches und regional differenziertes Verteilungsmuster, das für gesunde erwachsene Ratten bereits beschrieben wurde (Fritschy und Mohler, 1995) und so als Kontrollmuster gegenüber den Tieren aus den beiden anderen Gruppen dienen konnte (Abb. 6).

Die $\alpha 1$ -Untereinheit wies zusammen mit der $\gamma 2$ -Untereinheit die höchste Immunreaktivität im Kortex auf. Beide Untereinheiten waren ähnlich verteilt. Die $\alpha 1$ -Untereinheit ließ eine partiell erhöhte Dichte in den Schichten I, III – IV und IVa erkennen. In den Schichten II, V und IVb war die Immunreaktivität wesentlich geringer ausgeprägt. Bei der Untersuchung der immunhistochemisch gefärbten Bilder im Mikroskop bei hoher Auflösung fiel eine starke Anfärbbarkeit der Dendriten und des Somas der $\alpha 1$ -Interneurone auf. Die Pyramidenzellen waren schlecht zu lokalisieren. Bei beiden Rezeptor-Untereinheiten fiel eine starke Färbung des Neuropils auf.

Die $\alpha 2$ -Untereinheiten hatten ein spezifisches laminäres Verteilungsmuster im Kortex. Sie dominierte im Neokortex in den oberflächlichen Schichten (Schichten I – IV) mit Dominanz im piriformen Kortex, und war in den Schichten V und VI weniger stark exprimiert. Im Vergleich zur $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte diese Untereinheit eine stärkere Reaktivität in den Regionen, in denen die $\alpha 1$ -Untereinheit nicht oder nur gering vorkam und war durch geringere Immunreaktivität in den $\alpha 1$ dominierten Arealen gekennzeichnet. Das Neuropil war diffus gefärbt.

Im Gegensatz dazu war die $\alpha 3$ -Untereinheit in den tiefer gelegenen Schichten (Schicht V und VI) lokalisiert und imponierte durch selektive Immunreaktivität in bestimmten Arealen: Im motorischen Kortex, dem sekundären somatosensorischen (Par2), dem okzipitalen und perhinalen Kortex. Auch im piriformen Kortex war eine regional verstärkte Immunreaktivität zu erkennen, deren Ausprägung sich aber weniger überlegen darstellte als in den anderen Regionen. Der

frontale Kortex (FR) zeigte eine wenig ausgeprägte Anfärbbarkeit. Sie war in den Schichten I – IV kaum zu erkennen. Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung mit hoher Auflösung waren zahlreiche Pyramidenzellen mit ihren apikalen Dendriten zu erkennen.

Die $\alpha 5$ -Untereinheiten waren mit großer Dominanz in der Schicht VI zu lokalisieren. In den Schichten I – IV war die Untereinheit schwach und diffus verteilt und in Schicht V nur mäßig angefärbt. In der Schicht IV des primären sensorischen Kortex (Par1) war diese Untereinheit nicht nachzuweisen, was eine klare Abgrenzung zu den benachbarten Gebieten zuließ. Auch hier war ein regionales Verteilungsmuster zu erkennen, welches eine Unterscheidung dieser Untereinheit zu den anderen anhand des Sichtbefundes ermöglichte. Der frontale Kortex (FR) zeigte im Vergleich zur $\alpha 3$ -Untereinheit eine stärkere Reaktivität, wohingegen der somatosensorische (Par1 und Par2) und der okzipitale Kortex weniger angefärbt waren.

Die $\gamma 2$ -Untereinheit zeigte folgendes Verteilungsmuster, welches dem der $\alpha 1$ -Untereinheit sehr ähnlich war: stärkste Expression in den Schichten I, III – IV und IVa, wobei die ausgeprägteste Anfärbung in den cytoarchitektonischen Strukturen der Schichten III und IVa des Neokortex nachzuweisen war. Die Schichten II, V und IVb waren durch eine geringere Anfärbbarkeit gekennzeichnet. Das Neuropil ist bei hoher Auflösung gut zu erkennen und durch starke Immunreaktivität gekennzeichnet.

Im Gegensatz zum Kortex, der eine Nachweisbarkeit der Untereinheiten in den verschiedenen laminären Arealen zuließ, reagierte die Hippokampusformation bei der Immunfärbung selektiver. Die Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\gamma 2$ imponierten durch eine starke Anfärbbarkeit, während die $\alpha 1$ -Untereinheit dieser Region des Gehirns nur schwach nachzuweisen war und die $\alpha 3$ -Untereinheit in den meisten Fällen sogar fehlte. Die Hippokampusformation stellt bei der Reaktion mit den Antikörpern zum Nachweis von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten eine der am stärksten gefärbten Regionen des Gehirns dar.

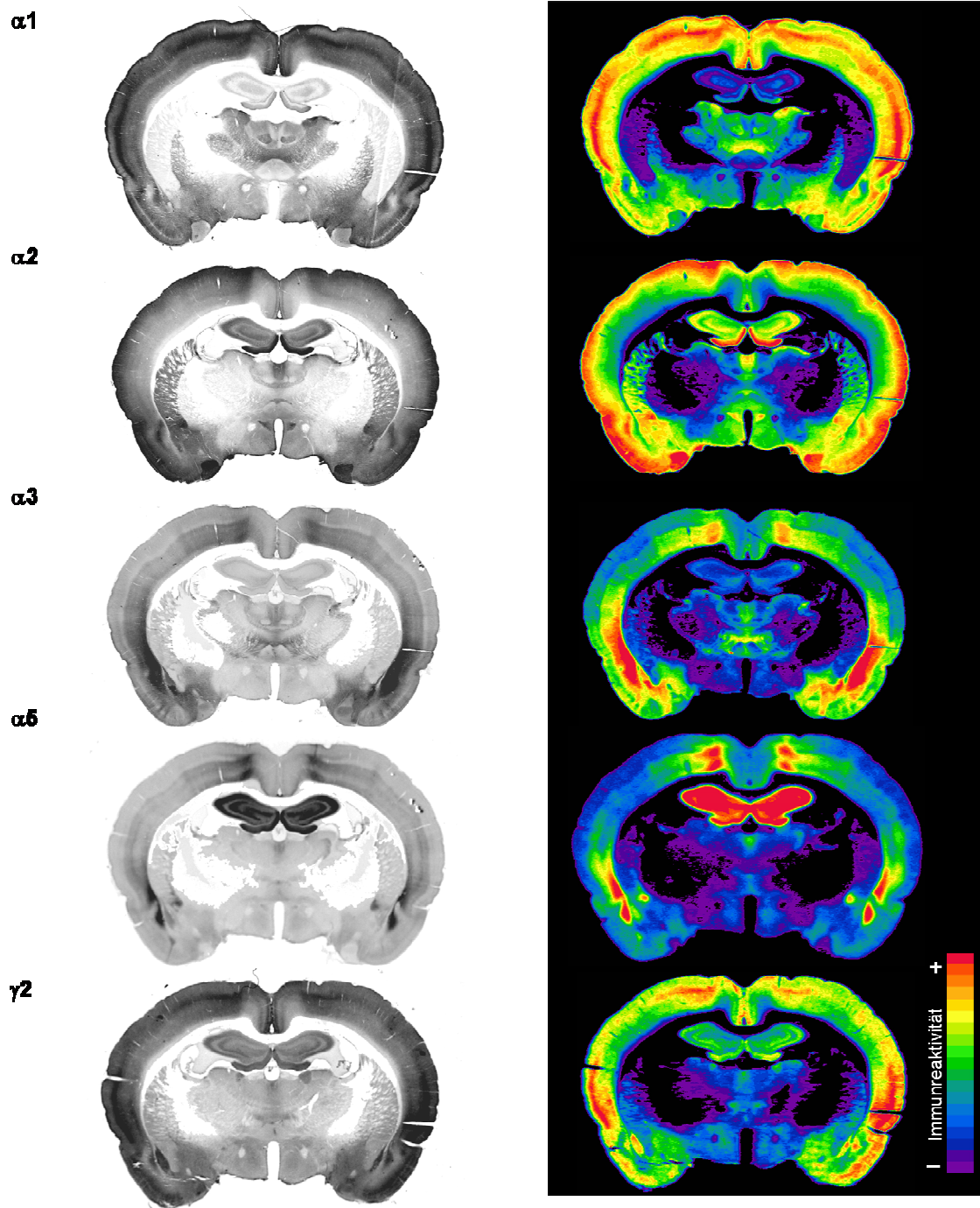


Abbildung 6: Immunhistochemische Färbung der Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ der Sham-operierten Kontrollgruppe. Es zeigt sich ein spezifisches und regional differenzielles Verteilungsmuster des gesunden Gehirns der adulten Ratte mit symmetrischem Muster in beiden Hemisphären. Die optische Dichte der Immunreaktivität ist sowohl in Graustufen als auch farbkodiert dargestellt. Die Skala für die Farbkodierung geht von schwarz für den Hintergrund bzw. keine Immunreaktivität über lila, blau, grün, gelb bis rot für das stärkste immunreaktive Signal.

Die Intensität der $\alpha 2$ -Untereinheit im Gyrus dentatus war verstärkt, während die anderen Anteile der Hippokampusformation eher als schwach reaktiv einzustufen waren. Die $\alpha 5$ -Untereinheit war im Gyrus dentatus kaum nachzuweisen, stellte aber im Hippokampus die bestimmende Untereinheit dar. Bei der Betrachtung unter dem Mikroskop ist eine hohe Immunreaktivität der $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten in der Pyramidenzellschicht und der dentritischen Schicht zu erkennen. Die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte eine spezifische Organisation in den dentritischen Schichten des Ammonshorns und eine typische Färbung der Interneurone der pyramidalen, granulären Zellschichten und der polymorphen Schicht des Gyrus dentatus. Die $\alpha 3$ -Interneurone waren kaum angefärbt (Abb. 6; Abb. 13).

5.2.2 Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im ipsi- und kontralateralen Neokortex nach MCAO (Ischämiezeit: 30 bzw. 60 min)

Nach einer MCAO änderten sich sowohl bei den Tieren mit einer Okklusionszeit von 30 min (n = 7) als auch bei den Tieren mit einer Ischämiezeit von 60 min (n = 5) die Verteilungsmuster der Untereinheiten der ipsi- und kontralateralen Hemisphären im Vergleich zu den Tieren aus der Kontrollgruppe (n = 8). Diese Veränderungen waren in den einzelnen cytoarchitektonischen Arealen unterschiedlich stark ausgeprägt und von der Dauer der Ischämiezeit abhängig (Abb. 4). Es wurden folgende cytoarchitektonische Strukturen im Neokortex unterschieden und einzeln ausgewertet: der primär motorische Kortex (frontal cortex, FR), der Hinterpfoten repräsentierende Kortex (hindlimb representation cortex, HL), der primäre und sekundäre somatosensorische Kortex (Par1, Par2); (Zilles et al., 1985) (Abb. 10 A; Abb. 12 A). Es wurden jeweils zwei Schnittebenen (Bregma -2 mm bis -2.3 mm, Bregma -2.6 mm bis -2.9 mm) der Kontrolltiere mit den identischen Schnittebenen der Tiere mit Reperfusion nach 30 min und der Tiere mit Reperfusion nach 60 min verglichen (Abb. 5 A/B). Bei der qualitativen und semiquantitativen Auswertung des ipsi- und kontralateralen Neokortex nach transienter Ischämie waren nach Immunfärbung in beiden Infarktgruppen Veränderungen zu erkennen (Abb. 7; Abb. 8).

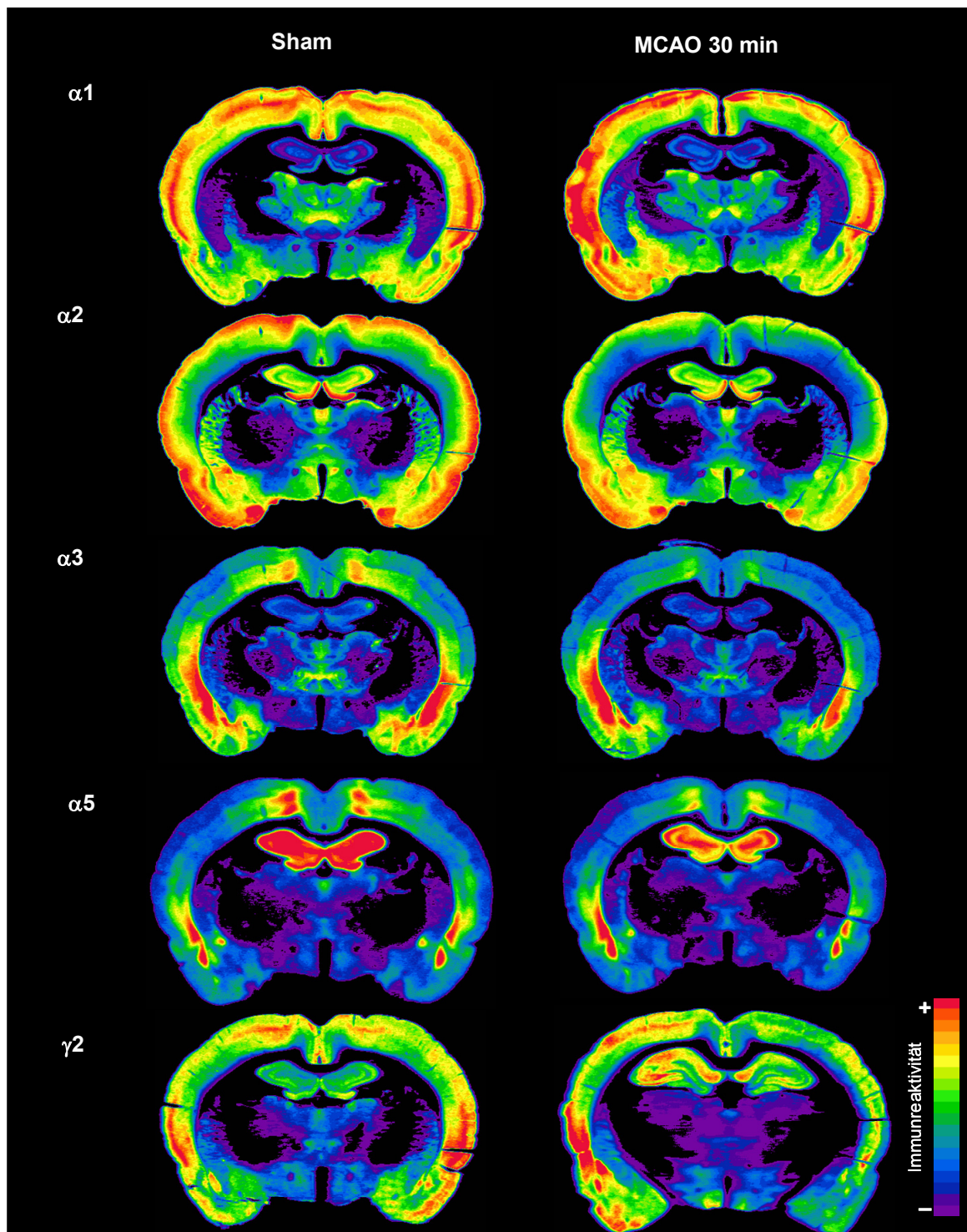


Abbildung 7: Farbkodierte Darstellung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α1, α2, α3, α5 und γ2 der schein-operierten Kontrollgruppe und der Tiere mit kleinen Infarkten (Okklusionszeit 30 min). In den Farbtintensitäten bildet sich die Dichte der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten α1, α2, α3, α5 und γ2 ab (rot: hohe Dichte; schwarz: niedrige Dichte). Die Läsion zieht ipsilateral eine Heraufregulation der Untereinheiten nach sich, die in den Untereinheit α1 und γ2 am ausgeprägtesten ist. Kontralateral ist eine differenzielle Reduktion der immunhistochemischen Anfärbbarkeit aller Untereinheiten zu erkennen.

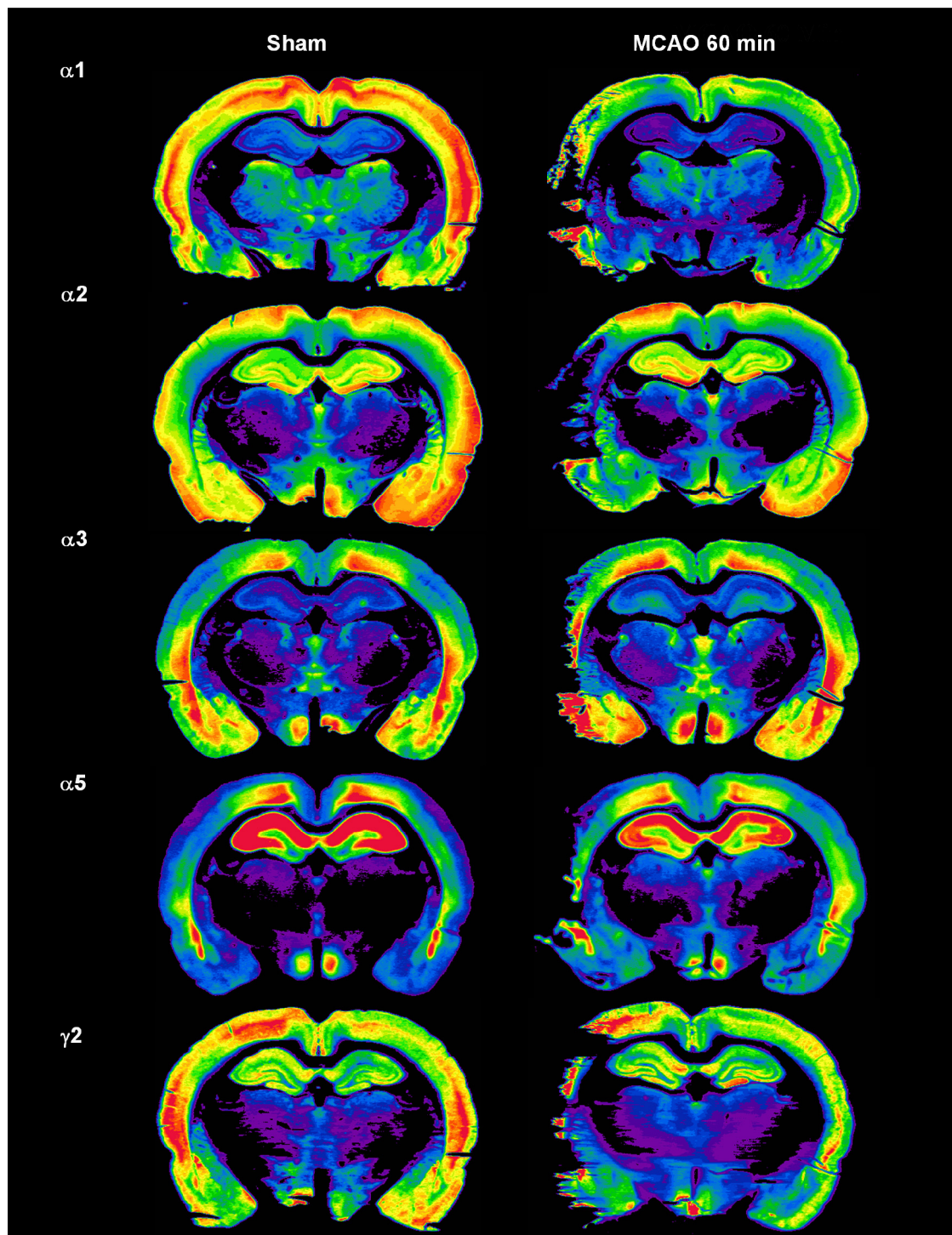


Abbildung 8: Farbkodierte Darstellung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ der schein-operierten Kontrollgruppe und der Tiere mit großen Infarkten, die ipsilateral Strukturverluste aufweisen. In den Farbtintensitäten bildet sich die Dichte der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ ab (rot: hohe Dichte; schwarz: niedrige Dichte). Kontralateral zeigen sich spezifische Veränderungen in Form einer Verringerung der Dichte der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ und einer signifikanten Heraufregulation der $\alpha 3$ -Untereinheit im kontralateralen Kortex.

Bei den Tieren mit einer 60 minütigen Durchblutungsunterbrechung war die Vergleichbarkeit einiger Abschnitte des somatosensorischen Kortex der ipsilateralen Seite durch den strukturellen Infarkt nicht gegeben. Auch an den Infarktträndern kam es bei einem Teil der Schnitte während der Immunhistochemie zu unspezifischen Färbereaktionen. Diese Areale wurden bei der Auswertung der Gehirnschnitte dieser Tiere nicht in die Messungen miteinbezogen. Auf diese Weise war gewährleistet, dass die Ergebnisse der Messungen sich nur auf die Expression der einzelnen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten des intakten Kortexgewebes bezogen.

Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Kortex nach 30 Minuten Okklusion

Die 30-minütige Ischämie zieht auf der ipsilateralen Seite eine Erhöhung der Expression der Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$ in Par1 und Erniedrigungen in Fr bezüglich der Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ nach sich. Die kontralaterale Seite dieser Schnitte war durch Abnahme der Anfärbbarkeit der $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -, $\alpha 3$ -, und $\gamma 2$ -Untereinheiten in Fr gekennzeichnet. In den Arealen HL, Par1 und Par2 konnte kontralateral eine niedrigere Immunreaktivität der $\gamma 2$ -Untereinheit nachgewiesen werden. (Abb. 9)

Die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte ipsilateral eine Erhöhung der Immunreaktivität in den Abschnitten Par2 (8.5 %, n.s.) und Par1, die im primären somatosensorischen Kortex (Par1) ausgeprägter und signifikant ausfiel (14.4 %, $p < 0.05$). In HL (- 1.3%, n.s.) und Fr waren geringe Senkungen der Immunreaktivität zu erkennen. Die Herunterregulation in Fr (- 5.4%, n.s.) setzte sich auch bei den Messungen der anderen Untereinheiten fort. Kontralateral war eine signifikante Verminderung der $\alpha 1$ -Untereinheit im frontalen Kortex (Fr: - 7.0 %, $p < 0.01$) abzuleiten. Die Strukturen HL, Par1 und Par2 zeigten in der rechten Hemisphäre im Vergleich zu den Kontrolltieren sehr geringe statistisch nicht signifikante Expressionsveränderungen (Abb. 10 B).

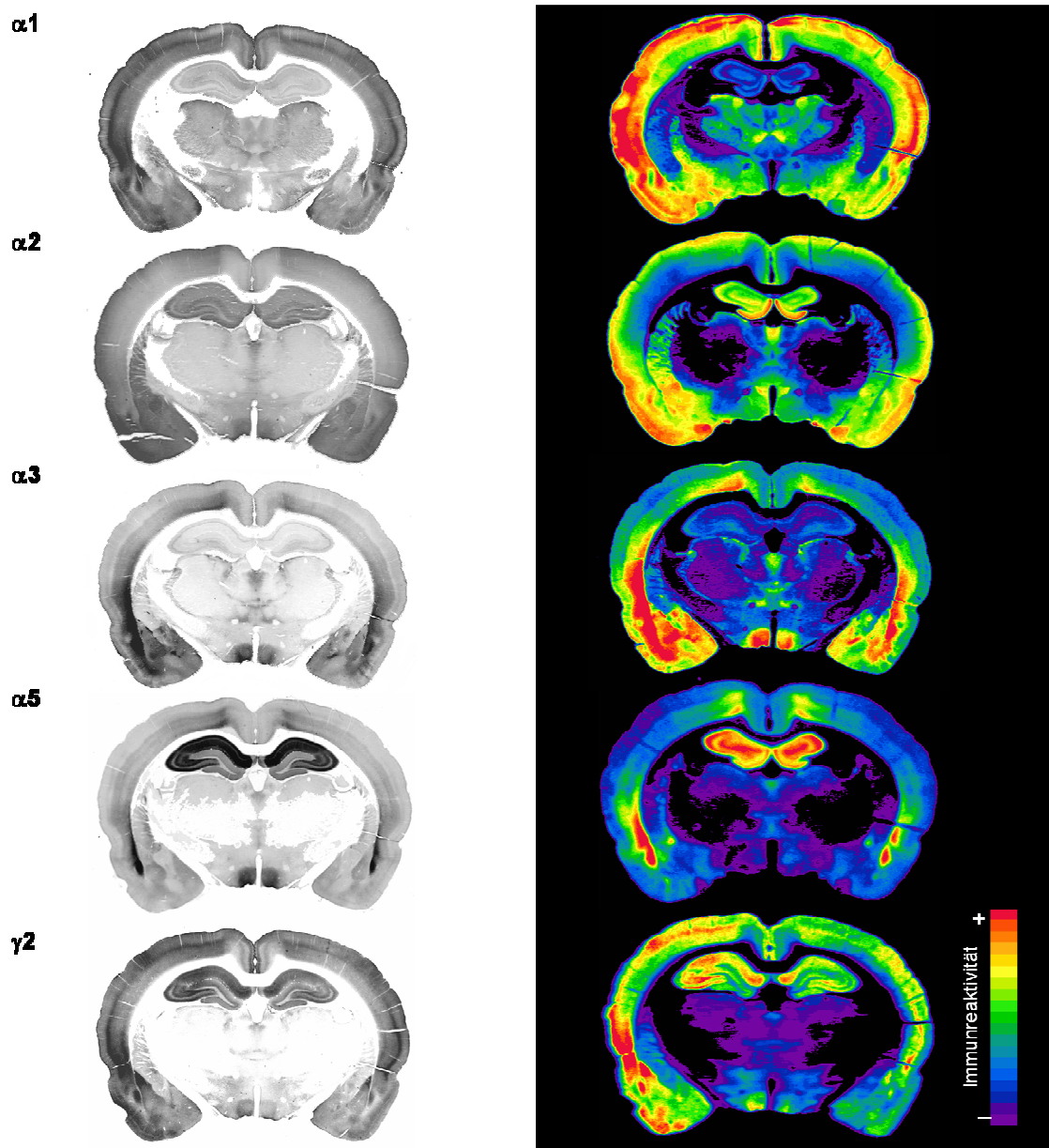


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbung der Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ der Tiere mit einer Ischämiezeit von 30 min. Es zeigt sich ipsilateral ein Anstieg der Dichte der Untereinheiten. Auf der kontralateralen Seite fällt eine generelle Abnahme der Anfärbbarkeit auf. Die optische Dichte der Immunreaktivität ist sowohl in Graustufen als auch farbkodiert dargestellt. Die Skala für die Farbkodierung geht von schwarz für den Hintergrund bzw. keine Immunreaktivität über lila, blau, grün, gelb bis rot für das stärkste immunreaktive Signal.

Die $\alpha 2$ -Untereinheit war hauptsächlich durch Erniedrigungen der Untereinheiten in den verschiedenen Arealen gekennzeichnet. Die Ausnahme stellten sowohl ipsilateral (6.4 %, n.s.) als auch kontralateral (5.2 %, n.s.) die Areale Par1 dar, in denen sich eine Heraufregulation der Untereinheiten zeigte. Die verminderte Anfärbbarkeit war ipsilateral in den Regionen Par1 (- 1.5%, n.s.), HL (- 3.5%, n.s.)

und Fr zu beobachten. Sie besaß in Fr die stärkste Ausprägung (- 10.5 %, $p < 0.01$). Die Verminderung der $\alpha 2$ -Untereinheit im kontralateralen frontalen Kortex (Fr), die schon bei der $\alpha 1$ -Untereinheit beschrieben worden war, war hier ebenfalls zu erkennen (- 9.8 %, $p < 0.05$). Auch in dieser Hemisphäre war eine leichtgradig reduzierte Immunreaktivität in Par2 (- 6 %, n.s.) zu verzeichnen, während in HL keine Änderungen zu messen waren (Abb. 10 B).

Bei der Untersuchung der $\alpha 3$ -Untereinheit in dieser Gruppe fiel auf der ipsilateralen Seite eine diskrete nicht signifikante Erhöhung der Rezeptordichte in Par2 (3.4 %, n.s.), Par1 (6.7 %, n.s.) und HL (2.8 %, n.s.) auf, wohingegen in Fr die Reaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe leichtgradig sank (Fr: -8.8 %, n.s.). Die Gegenseite wurde durch eine signifikante Abwärtsregulation der Rezeptor-Untereinheit in Fr charakterisiert (-12.8 %, $p < 0.05$). Auch in der Hinterpfoten repräsentierenden Region war eine nichtsignifikante niedrigere Expression zu beobachten (HL: -6.7 %, n.s.). Die Abschnitte Par1 und Par2 ließen jeweils einen geringen Anstieg der Reaktivität erkennen (Par1: 3.2 %, n.s.; Par2: 8.6 %, n.s.) (Abb. 10 B).

Die $\alpha 5$ -Untereinheit wies bezüglich der Veränderungen des Verteilungsmusters ähnliche Charakteristika auf wie die $\alpha 3$ -Untereinheit. So war in der linken Hemisphäre ein Anstieg der Rezeptordichte in Par2 (12.9 %, n.s.), Par1 (17.5 %, $p < 0.01$) und HL (3.9 %, n.s.) zu beobachten und in der Region des primären motorischen Kortex ein signifikantes Absinken der Reaktivität (Fr: -11.2 %, $p < 0.05$). In der rechten Hemisphäre wurden Expressionsrückgänge in Fr (-9.4 %, n.s.) und HL (-4.6 %, n.s.) gemessen, während Par1 und Par2 eine Zunahme der $\alpha 5$ -Untereinheiten zeigten. Signifikante Unterschiede stellten sich hier nicht dar (Par1: 5.5 %, n.s.; Par2: 3.6 %, n.s.) (Abb. 10 B). Der Vergleich zwischen der ipsilateralen Seite der Schnitte, die spezifisch für die $\gamma 2$ -Untereinheit gefärbt worden waren, mit der identischen Seite der Kontrolltierschnitte ergaben eine geringere Anfärbbarkeit in den Arealen Par2 (-2 %, n.s.) und Fr. Auch bei dieser Untereinheit waren die signifikanten Veränderungen in Fr am ausgeprägtesten (-16.4 %, $p < 0.01$). Die Messung des primär somatosensorischen Kortex lieferte Ergebnisse in Form eines

Anstiegs der Expressionsdichte dieser Untereinheit (Par1: 10 %, n.s.). Diese Immunreaktivitätssteigerung war auch bei den übrigen Untereinheiten zu erkennen. Die kontralaterale Seite imponierte durch die gleichsinnige und signifikante Reduktion der $\gamma 2$ -Untereinheit in allen gemessenen Regionen: Fr (-17.2 %, $p < 0.01$), HL (-12.5 %, $p < 0.05$), Par1 (-11,1 %, $p < 0.001$) und Par2 (-10.5 %, $p < 0.01$) (Abb. 10 B).

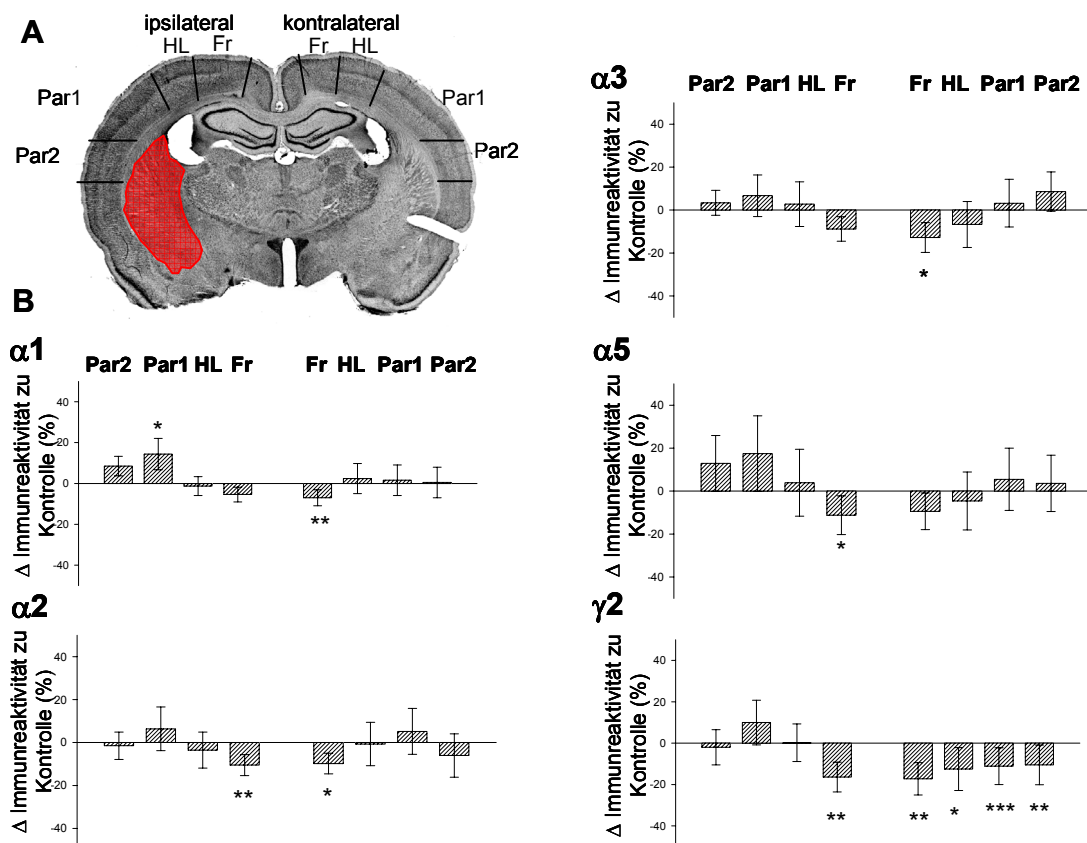


Abbildung 10: (A) Schematische Darstellung der ausgewerteten kortikalen Areale. (B) Semiquantitative Analyse der regionalen Veränderungen der Immunreaktivität der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Es wurden die relativen Unterschiede der Farbtintensitäten als optische Dichtewerte gemessen. Die Gruppe mit fokalen subkortikalen Infarkten (MCAO 30 min) wird mit der scheinoperierten Kontrollgruppe verglichen. Signifikante Unterschiede (<0.05 , <0.01 bzw. <0.001) werden durch ein, zwei, bzw. drei Sternchen gekennzeichnet. Ipsilateral zeigen die Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, und $\gamma 2$ eine signifikante Verringerung der relativen optischen Dichte im Areal Fr, wohingegen die tendenzielle Heraufregulation in Par1 nur für die $\alpha 1$ -Untereinheit signifikant ist. Auch kontralateral ist die Reduktion der Rezeptordichte der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, und $\gamma 2$ signifikant. Die $\gamma 2$ -Untereinheit imponiert durch signifikante Herunterregulation der Dichte auch in den kontralateralen Arealen HL, Par1 und Par2.

Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im Kortex nach 60 Minuten Okklusion

Die 60-minütige Ischämie zeigte ipsilateral Erhöhungen der Immunreaktivität in den Kortexarealen HL und Fr der $\alpha 3$ -Untereinheit. Die $\gamma 2$ -Untereinheit wies kontralateral eine signifikante Reduktion der Anfärbbarkeit in Par1 auf (Abb. 11). Die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte in dieser Gruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Veränderungen in allen gemessenen Kortexregionen. Auf der durch Teilischämie beeinflussten Seite war die Expression der Untereinheit in den Abschnitten HL (-6.5 %, n.s.) und Fr (-10 %, n.s.) am stärksten reduziert. Die Reduktion der Immunreaktivität auf der kontralateralen Seite war in Fr (-2.4 %, n.s.) in geringerem Maße ausgeprägt. Auch die Messungen von HL (-10.3 %, n.s.), Par1 (-13.1 %, n.s.) und Par2 (-25.1 %, n.s.) zeigten eine reduzierte Expression, die allerdings kein Signifikanzniveau erreichten (Abb. 12 B).

Die $\alpha 2$ -Untereinheit zeigte ebenfalls keine signifikanten Veränderungen in allen Arealen. Die Veränderungen glichen dem Muster der $\alpha 1$ -Untereinheit. Es war ipsilateral eine abnehmende Anfärbbarkeit in den Regionen HL (-3.5 %, n.s.) und Fr (-7.6 %, n.s.) zu erkennen.

Dies war auch im frontalen Kortex (Fr: -3.1 %, n.s.), im Hinterpfoten repräsentierenden Kortex (HL: -19.7 %, n.s.), im primär somatonsensiblen Kortex (Par1: -21 %, n.s.) und im sekundär somatonsensiblen Kortex (Par2: -18 %, n.s.) der Gegenseite zu beobachten (Abb. 12 B).

Die Umgestaltungen der $\alpha 3$ -Untereinheit waren ipsilateral durch signifikante Anstiege der Rezeptorexpression in den Kortexarealen HL (31.1 %, $p < 0.05$) und Fr (17.5 %, $p < 0.01$) gekennzeichnet. In der kontralateralen Hemisphäre stieg die Immunreaktivität in den Arealen Fr, Par1 (4.5 %, n.s.) und Par2 (12.2 %, n.s.) an. In Fr war der Anstieg am stärksten ausgeprägt und zeigte bei der statistischen Auswertung signifikante Ergebnisse (14.7 %, $p < 0.01$). Das Areal HL ließ eine äußerst geringe Abnahme der Reaktivität erkennen (HL: - 1.9 %, n.s.) (Abb. 12 B).

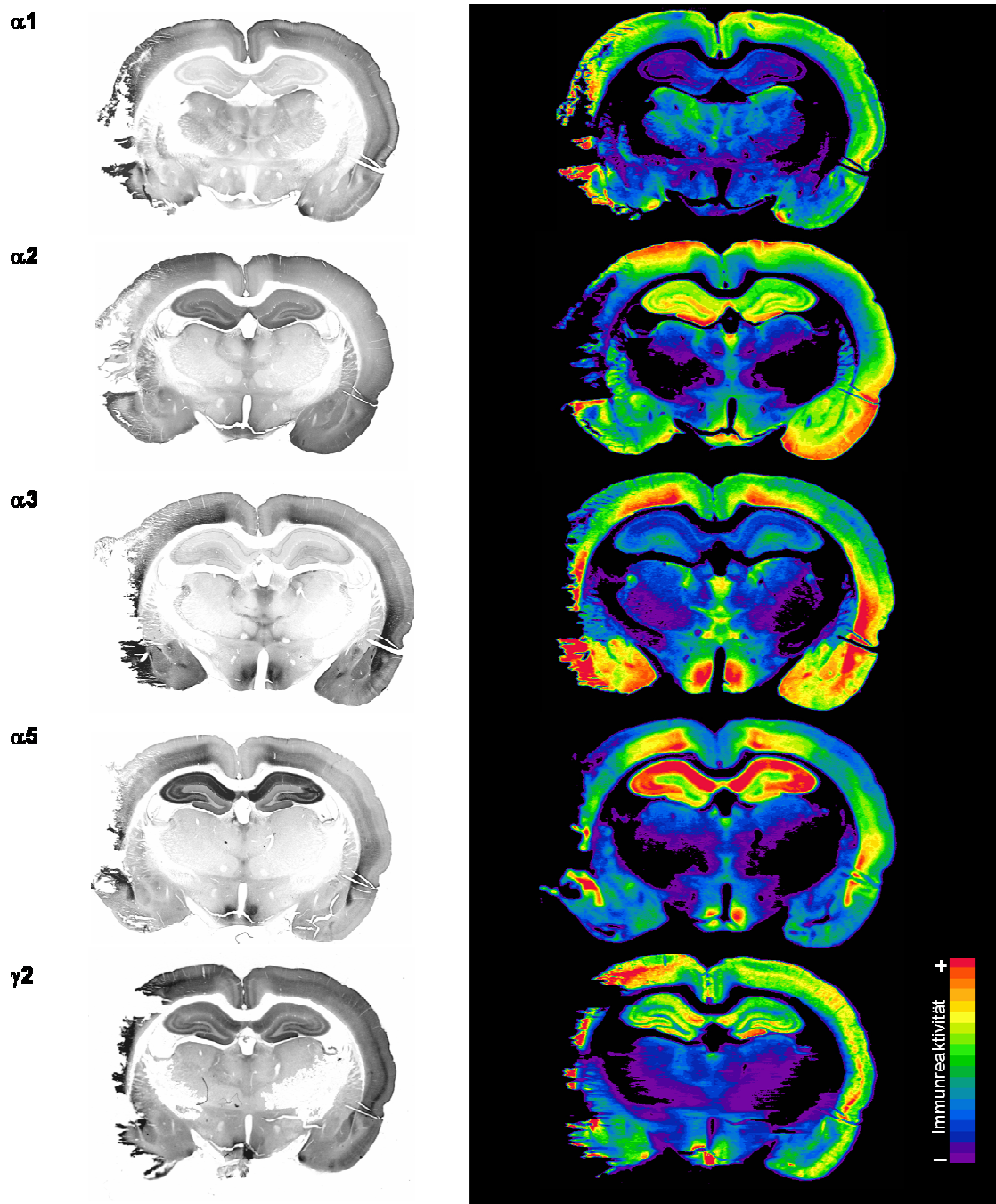


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung der Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ der Tiere mit großen Infarkten. Es zeigen sich ipsilateral strukturelle Verluste, sodass kortikal lediglich die kontralaterale Hemisphäre und kleine Areale im Randgebiet der Läsion in die Auswertung miteinbezogen werden können. Es fällt eine Abnahme der Anfärbbarkeit der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ und eine Heraufregulation der $\alpha 3$ -Untereinheit auf. Die höhere Dichte dieser $\alpha 3$ -Untereinheit ist in der Regionen besonders ausgeprägt, die homotop zum Infarktareal liegt. Die optische Dichte der Immunreaktivität ist sowohl in Graustufen als auch farbkodiert dargestellt. Die Skala für die Farbkodierung geht von schwarz für den Hintergrund bzw. keine Immunreaktivität über lila, blau, grün, gelb bis rot für das stärkste immunreaktive Signal.

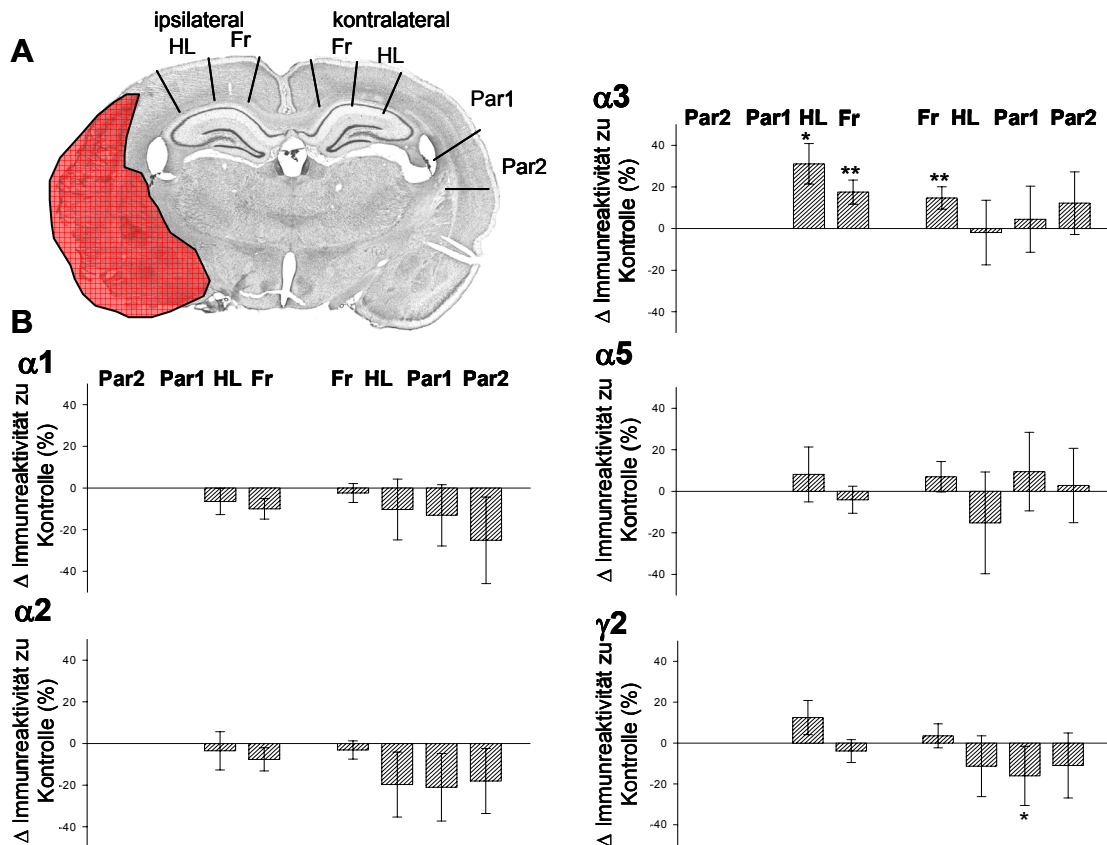


Abbildung 12: (A) Schematische Darstellung der ausgewerteten kortikalen Areale. (B) Semi-quantitative Analyse der regionalen Veränderungen der Immunreaktivität der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Es wurden die relativen Unterschiede der Farbintensitäten als optische Dichtewerte gemessen. Einer Gruppe von Tieren mit fokalen kortikalen und subkortikalen Infarkten mit ipsilateralen Strukturverlusten (MCAO 60 min) wird mit einer Sham-operierten Kontrollgruppe verglichen. Signifikante Unterschiede (<0.05, <0.01 bzw. <0.001) werden durch ein, zwei, bzw. drei Sternchen gekennzeichnet. In den ipsilateralen intakten Randarealen HL und Fr und kontralateral zeigt sich eine Herunterregulation der Untereinheiten α1, α2, α5 und γ2, welche im Areal Par1 der γ2-Untereinheit signifikant ist. Die α3-Untereinheit zeigt eine signifikante Heraufregulation sowohl in den ipsilateralen Randarealen HL und Fr als auch kontralateral in Fr.

Ipsilateral war für die α5-Untereinheit eine Steigerung der Anfärbbarkeit in dem Areal Fr (8.1 %, n.s.) zu registrieren. In dem Kortexabschnitt, der die Hinterpfoten repräsentiert war eine reduzierte Immunreaktivität zu erfassen (-4.1 %, n.s.). Die Expression der α5-Untereinheit stieg in der kontralateralen Schnitthälfte in den Kortexregionen Fr (7 %, n.s.), Par1 (9.5 %, n.s.) und Par2 (2.8 %, n.s.) an, während die Expression in HL abfiel (-15.2 %, n.s.). Diese Reduktion der Rezeptordichte in HL der kontralateralen Seite war auch bei der Betrachtung aller anderen Untereinheiten auffällig (Abb. 12 B).

Der Vergleich der Immunreaktivität der $\gamma 2$ -Untereinheit der Tiere, die einer Operation mit einer Ischämiedauer von 60 min unterzogen worden waren und der schein-operierten Kontrolltiere ergab folgende Veränderungen: ipsilateraler Anstieg der Untereinheit in HL (12.5 %, n.s.) und Reduktion in Fr (-3.9 %, n.s.), signifikante Reduktion der $\gamma 2$ -Expression der nicht geschädigten Hemisphäre in Par1 (-16 %, $p < 0.05$), geringe kontralaterale Zunahme der Immunreaktivität in Fr (3.6 %, n.s.) und nicht signifikante Abnahme der Immunreaktivität in HL (-11.3 %, n.s.) und Par2 (-10.9 %, n.s.) der kontralateralen Seite (Abb. 12 B).

5.2.3 Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in den ipsi- und kontralateralen subkortikalen Strukturen nach MCAO (Ischämiezeit: 30 bzw. 60 min)

Die Hippokampusformation setzt sich aus dem Hippokampus und dem Gyrus dentatus zusammen. Sie wurde repräsentativ für die intakten subkortikalen Anteile, die durch die transiente Ischämie beeinflusst worden waren, in beiden Hemisphären auf Veränderungen der Expression der verschiedenen Untereinheiten untersucht. Thalamus und Striatum waren teilweise während des Infarktgeschehens strukturell geschädigt worden. Aus diesem Grund wurden sie in Form einer tabellarischen Übersicht dargestellt (Tabelle 1).

Die Auswertung der relativen optischen Dichten erfolgte für jede der Untereinheiten ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\gamma 2$) gesondert. Es wurde der prozentuale Anstieg bzw. die prozentuale Abnahme der Expression der Rezeptoruntereinheiten bestimmt (Abb. 13 B). Hierbei wurden die scheinoperierten Tiere ($n = 8$) zum einen mit den Tieren, deren Okklusion 30 Minuten dauerte ($n = 7$) und zum anderen mit den Tieren, deren Okklusionszeit 60 Minuten ($n = 5$) betrug, verglichen. Die Änderungen der relativen optischen Dichten unterschieden sich sowohl in den untersuchten Gruppen als auch in den verschiedenen Untereinheiten voneinander (Abb. 13 A/B). Die immunhistochemische Färbung der $\alpha 3$ -Untereinheit ergab bei den Kontrolltieren ein sehr schwaches Signal, so dass kleinste Änderungen in den Experimentalgruppen sehr große Werte bei der Auswertung ergaben, die nicht im

Verhältnis zu den Änderungen der anderen Untereinheiten standen. So wurde die $\alpha 3$ -Untereinheit nicht in die Beurteilung miteinbezogen.

Tabelle 1: *Veränderungen der relativen optischen Dichte der Immunreaktivität von verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in Thalamus und Striatum nach fokalen, kortikalen Infarkten.*

<i>Unter- einheit</i>	<i>Gehirn- region</i>	Sham		Okklusionszeit 30 min		Okklusionszeit 60 min	
		(n = 8)		(n = 7)		(n = 5)	
		<i>Ipsi- Lateral</i>	<i>Kontra- lateral</i>	<i>Ipsi- lateral</i>	<i>Kontra- lateral</i>	<i>Ipsi- lateral</i>	<i>Kontra- lateral</i>
		<i>Mittelw. ± SD</i>	<i>Mittelw. ± SD</i>	<i>Mittelw. ± SD</i>	<i>Mittelw. ± SD</i>	<i>Mittelw. ± SD</i>	<i>Mittelw. ± SD</i>
$\alpha 1$	Thalamus	86 ± 7	78 ± 7	83 ± 4	74 ± 4	91 ± 14	71 ± 10
	Sriatum	37 ± 4	27 ± 4	44 ± 2	27 ± 5	14 ± 14	10 ± 4
$\alpha 2$	Thalamus	43 ± 5	40 ± 4	36 ± 2	31 ± 3	40 ± 19	30 ± 6
	Sriatum	95 ± 3	80 ± 7	108 ± 9	76 ± 3	28 ± 6	79 ± 11
$\alpha 3$	Thalamus	42 ± 4	41 ± 4	46 ± 3	46 ± 4	**61 ± 9	**53 ± 8
	Sriatum	33 ± 2	31 ± 3	38 ± 3	29 ± 4	21 ± 20	**45 ± 7
$\alpha 5$	Thalamus	25 ± 5	25 ± 6	23 ± 5	22 ± 4	30 ± 6	28 ± 5
	Sriatum	34 ± 4	30 ± 5	33 ± 5	15 ± 2	8 ± 19	40 ± 8
$\gamma 2$	Thalamus	61 ± 8	53 ± 7	46 ± 5	*35 ± 4	81 ± 15	46 ± 7
	Sriatum	62 ± 6	47 ± 7	60 ± 3	27 ± 4	31 ± 30	44 ± 8

Die Hippokampusformation änderte ihr Verteilungsmuster sowohl bei den Tieren, die keine kortikalen Infarkte aufwiesen als auch bei den Tieren mit großen strukturellen Infarkten der durch die Ischämie beeinflussten Anteile der linken Hemisphäre. Dabei handelt es sich durchweg um Reduktionen der Immunreaktivität, die im Gyrus dentatus und in der CA1-Region des Hippokampus am ausgeprägtesten waren. In beiden Gruppen konnten alle Anteile der Hippokampusformation gemessen werden, da hier die mikroskopische Betrachtung der Schnitte keine strukturellen Schäden dieser Region erkennen ließ. Die Umgestaltungen der subkortikalen Struktur unterschieden sich in Ausprägung und Orientierung von den Abweichungen im Neokortex.

Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in der Hippokampusformation nach 30 min Okklusion

Nach einer 30 minütigen Teilischämie in den durch die A. cerebri media versorgten Arealen waren in der ipsilateralen Hippokampusformation Reduktionen der $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten zu registrieren. Auf der kontralateralen Seite waren die Herunterregulationen der $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten signifikant (Abb. 13 B).

Für die $\alpha 1$ - Untereinheit war sowohl ipsilateral (-10 %, n.s.) als auch kontralateral (-13.4 %, n.s.) eine verminderte Immunreaktivität zu erkennen. Auch die $\alpha 2$ -Untereinheit zeigte in beiden Hemisphären einen Expressionsrückgang in der Hippokampusformation. Diese Reduktion war auf der Seite mit Infarktgeschehen etwas weniger ausgeprägt (- 9.2 %, $p < 0.01$) als in der kontralateralen Hemisphäre (- 11 %, $p < 0.01$) (Abb. 13). Die Auswertung der $\alpha 5$ -Untereinheit ergab eine Abnahme der relativen optischen Dichte auf der Infarktseite (- 10.7 %, $p < 0.05$) und auf der dem Infarkt abgewandten Seite (- 9.8 %, $p < 0.001$) (Abb. 13). Der Vergleich der Hippokampusformation zwischen den Sham-Tieren und den Tieren nach 30 Minuten Okklusion ergab für die $\gamma 2$ -Untereinheit eine Immunreaktivitätsverminderung. Diese waren sowohl ipsilateral (- 16.7 %, $p < 0.01$) als auch kontralateral (- 21.5 %, $p < 0.01$) zu erkennen (Abb. 13).

Expression der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten in der Hippokampusformation nach 60 min Okklusion

Nach einer Okklusionszeit von 60 Minuten waren die Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten-Expression geringer als nach einer 30 minütigen Ischämie.

Die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte eine geringe Reduktion sowohl im ipsilateralen (- 10 %, n.s.) als auch im kontralateralen (-20.3 %, n.s.) Hippokampus. Bei der $\alpha 2$ -Untereinheit war ein ähnliches Veränderungsmuster zu erkennen. Die Abwärtsregulation auf der kontralateralen Seite (-19.2 %, $p < 0.05$) war ausgeprägter als auf der ipsilateralen Seite (-6.9 %, n.s.). In Bezug auf die $\alpha 5$ -Untereinheit ergab sich

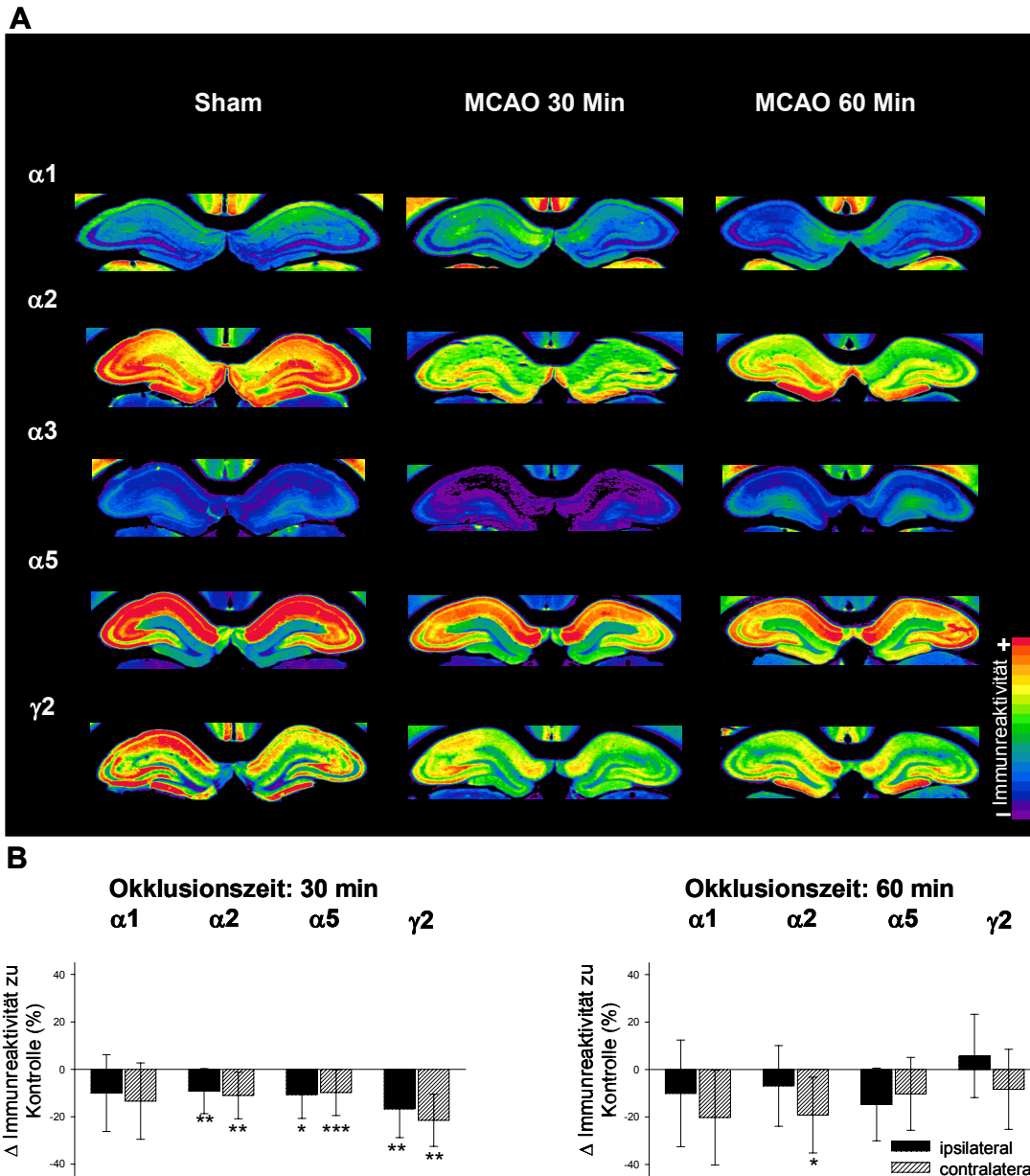


Abbildung 12: (A) Farbkodierte Darstellung der Veränderungen der Dichte der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ der ipsilateralen und kontralateralen Hippokampusformation von einer Sham-operierten Kontrollgruppe im Vergleich zu einer Gruppe mit 30 minütiger MCAO und einer Gruppe nach 60 minütiger MCAO (rot: hohe Dichte; schwarz: niedrige Dichte). (B) Relative Unterschiede der Farbintensitäten als optische Dichtewerte in der Hippokampusformation. Einer Gruppe von Tieren mit fokalen subkortikalen Infarkten (MCAO 30 min), bzw. mit großen Infarkten (MCAO 60 min) wird mit einer Kontrollgruppe, verglichen. Signifikante Unterschiede (<0.05 , <0.01 bzw. <0.001) werden durch ein, zwei, bzw. drei Sternchen gekennzeichnet. Man erkennt in beiden Abbildungen die ausgeprägte ipsilaterale und kontralaterale Herunterregulation aller Untereinheiten vor allem nach MCAO 30 min.

ipsilateral (-14.7 %, n.s.) und kontralateral (-10.3 %, n.s.) eine Reduktion der Immunreaktivität. Die γ 2-Untereinheit zeichnete sich durch einen ipsilateralen Anstieg der Immunreaktivität (5.7 %, n.s.) und kontralateral durch eine Abnahme der Anfärbbarkeit (-8.3 %, n.s.), die schon für die anderen Untereinheiten gezeigt werden konnten, aus (Abb. 13).

6 Diskussion

Mit der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es nach Okklusion der A. cerebri media zu einer bihemisphärischen Dysregulation von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten kommt. Die Änderungen der regional differenziellen Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten ließen sich sowohl in den kortikalen als auch in den subkortikalen Hirnarealen nachweisen. Die Ausprägung der strukturellen Veränderungen korreliert stark mit der Dauer der Ischämie. Nach einer 30 minütigen Durchblutungsunterbrechung resultieren kleine subkortikale Infarkte mit strukturell intaktem Kortexgewebe der ipsilateralen Hemisphäre, welches eine Heraufregulation der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten aufweist. Die kontralaterale Herunterregulation der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ steht im Einklang mit den Veränderungen bei großen Infarkten, welchen eine Ischämiezeit von 60 Minuten zugrunde gelegt wird. Bihemisphärische Veränderungen kortikaler Infarkte konnten auch im Photothrombosemodell nachgewiesen werden. Ferner wurde an diesem Modell eine Tendenz der Heraufregulation der $\alpha 3$ -Untereinheit im homotop kontralateralen Kortex beschrieben, welche die vorliegende Studie bestätigt (Redecker et al., 2002).

6.1 Bihemisphärische Dysregulation

Die vorliegende Studie zeigt globale bihemisphärische Änderungen der Expressionsmuster der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten nach kleinen Infarkten mit intaktem Kortexgewebe und großen Infarkten mit kortikalen und subkortikalen Strukturveränderungen. Diese Befunde decken sich mit früheren Studien, in welchen die kortikale Erregbarkeit nach unilateralen Infarkten im Mediastromgebiet untersucht wurden. Die Veränderungen bezüglich der inhibitorischen Mechanismen korrelieren mit dem Bindungsverhalten des GABA_A-Rezeptors (Schiene et al., 1996). Auch andere autoradiografische Studien mit dem GABA-Antagonisten Muscimol stehen im Einklang mit der vorliegenden

Studie. Nach einem unilateralen Infarkt kommt es in gleichen Zeiträumen zu einer Reduktion der Bindung des Liganden Muscimol in der direkten Umgebung des Infarkts (Qu et al. 1998a; Que et al., 1999). Gründe für verminderte bzw. gesteigerte Bindungsdynamik eines Liganden können nicht nur eine Veränderung der absoluten GABA_A-Rezeptor-Dichte sondern auch eine veränderte Affinität der Rezeptoren für GABA sein.

Die auffällige Herunterregulation der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\gamma 2$, die im Kortex, Hippokampus und Thalamus beider Hemisphären der erwachsenen Ratte in hohem Maße exprimiert sind, lassen auf eine generelle Reduktion der Rezeptordichte in der kontralateralen Hemisphäre schließen. Dies ist besonders für die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ bemerkenswert, die am reichlichsten im adulten Kortex der Ratte zu finden sind und auch die Untereinheiten darstellen, welche im kortikalen GABA_A-Rezeptor vorherrschen. Die Änderungen der Expressionsmuster der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\alpha 5$, die sich sowohl unmittelbar nach einem Infarkt mit intaktem Kortexgewebe als auch bei großen Infarkten manifestieren, weisen darauf hin, dass sich zudem die Rezeptorzusammensetzung ändert.

Die hier erhobenen Befunde der bihemisphärischen Dysregulation decken sich weitgehend mit elektrophysiologischen Studien, die die kortikale Inhibition nach fokaler zerebraler Ischämie gemessen haben (Buchkremer-Ratzmann et al., 1996; Reinecke et al., 1999). Die Messungen ergaben eine bihemisphärische Dysregulation des inhibitorischen Systems mit einer deutlichen Steigerung der Erregbarkeit in weiten Teilen des Kortex. Diese Vorgänge entsprechen von Monakows Konzept (Monakow, 1914), nach dem es nach kortikalen Läsionen in entlegenen gesunden Hirnregionen zu Funktionsänderungen kommt, die als so genannte Diaschisis bezeichnet werden. Hierzu zählen neben der elektrischen Aktivität mit Steigerung bzw. Verminderung der Erregbarkeit auch die metabolischen Funktionen und der zerebrale Blutfluss (Andrews, 1991). Diese Funktionsänderungen beschränken sich nicht nur auf den Bereich der Läsion, sondern beeinträchtigen auch die gesunde Hemisphäre (Lagrece et al., 1987; Dobkin et al., 1989). Entsprechend der vorliegen-

den Studie, nach der globale Veränderungen in erster Linie nach großen kortikalen Infarkten mit Strukturverlusten und nicht nach kleinen subkortikalen Läsionen induziert werden, zeigen sich auch in anderen Studie bihemisphärische Veränderungen hauptsächlich bei Beteiligung des gesamten MCA-Territoriums (Reinecke et al., 1999) oder wenn durch die Ischämie tiefer gelegene kortikale Schichten beschädigt wurden (Buchkremer- Ratzmann und Witte, 1997). Die Befunde deuten darauf hin, dass die Infarktgröße mit dem Ausmaß der Veränderungen im GABAergen System korreliert.

Die Hippokampusformation und die Kerne des Thalamus sind mit dem Kortex über neuronale Verbindungen und multiple kortiko-thalamische Kreisläufe verbunden. Die tendenziell gleichsinnigen Veränderungen im Kortex, in der Hippokampusformation und im Thalamus sind ein Zeichen dafür, dass eine Änderung des intakten Gehirngewebes durch transsynaptische Prozesse moduliert wird. Dieser Zusammenhang wurde 2002 von Redecker et al. in einer gesonderten Studie untersucht, die sich das Photothrombose-Modell zu Nutzen macht. Die bihemisphärischen Dysregulationen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten können durch pharmakologische Blockade des N-methyl-D-aspartat-Rezeptors komplett blockiert werden (Redecker et al., 2002). Dabei wurde der nicht kompetitive NMDA-Antagonist MK-801 eingesetzt, der die frühe glutamatinduzierte Hyperexzitabilität im hypoxischen Areal verhindert. Die Hyperexzitabilität äußert sich in Form von Kaskaden synchroner Entladungen exzitatorischer Neurone des gesamten kortikalen Geflechts (Lee et al. 1999). Diese Mechanismen sind Folge der reduzierten Funktionalität des GABAergen Systems (Redecker et al., 2000). Es wird deutlich, dass eine medikamentöse Blockade des GABAergen Systems und ein Ischämieereignis gleichsinnige Veränderungen nach sich ziehen (Mies et al., 1993b). Des Weiteren ist eine generelle Inhibition der Proteinbiosynthese als Folge erhöhter Exzitabilität im ischämischen Areal ist denkbar.

In anderen Studien wurde der Ursprung verschiedener Modulationsprozesse molekularbiologisch untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach

Induktion einer globalen Ischämie in kortikalen und subkortikalen Strukturen weniger mRNA zur Bildung von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten zur Verfügung steht (Li et al., 1993), was mit einer reduzierten Inhibition gekoppelt ist (Redecker et al., 2000; Thilmann et al., 1986). Die aktuelle Studie hingegen zeigt auch in der kontralateralen Hemisphäre dysregulatorische Veränderungen.

6.2 Heraufregulation von GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten im strukturell intakten ipsilateralen Kortexgewebe des Medialstromgebietes bei kleinen subkortikalen Infarkten (Ischämiezeit: 30 min)

Bei Tieren mit kleinen subkortikalen Infarkten gibt es einen teilischämischen, vom Läsionskern entfernt liegenden kortikalen Bereich im ipsilateralen Medialstromgebiet. Hier ist das Kortexgewebe strukturell intakt und weist möglicherweise auch funktionelle Defizite infolge einer Ischämie auf. Die relativ kurze Ischämiedauer induziert keine strukturellen kortikalen Schäden. Die funktionellen Veränderungen dieser kortikalen Areale sind auf eine Teilischämie zurückzuführen (Hossmann, 1993). Diese wurden mittels in vitro Messungen von Feldpotentialen ipsilateral nach transientscher Ischämie am MCAO-Modell nachgewiesen. In diesem Bereich zeigte sich ein erheblicher Rückgang der Erregbarkeit (Neumann-Haefelin und Witte, 2000). Eine Reduktion der Erregbarkeit kann auf eine gesteigerte Aktivität des inhibitorischen Systems hindeuten. Diese verstärkte Aktivität des GABAergen System geht möglicherweise auf eine Heraufregulation sämtlicher Untereinheiten in den Kortexarealen Par1, Par2 und HL in dieser Region zurück. Im Einklang mit der reduzierten Erregbarkeit stehen auch Studien, nach denen es zu einer verminderten synaptischen Übertragung im teilischämischen Gewebe kommt. Dies konnten Bolay und Dalkara 1998 in Studien am MCAO-Modell anhand motorischer und sensorischer evozierter Potentiale am Rattengehirn in vivo zeigen. Auch im Hippokampus kommt es nach transientscher Vier-Gefäß-Okklusion, die im Gegensatz zur vorliegenden Studie eine globale Ischämie und keine fokale

Ischämie induziert, zu spezifischen Modifikationen. Sie führt zu einer Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung durch gesteigerte Inhibition (Howard und Thompson, 1998; Shinno et al., 1997).

Bei der Betrachtung von kortikalen Infarkten kann man keine scharfe Grenze zwischen dem infarzierten, nekrotischen und dem intakten Hirngewebe ziehen. Zwischen diesen Arealen liegt die so genannte Periinfarktzone (Penumbra): direkte Infarktumgebung, die einer partiellen Ischämie ausgesetzt war. Es ist anzunehmen, dass das kortikale Areal Fr dieser Randzone entspricht und dass der Kern der Ischämieschädigung in den übrigen untersuchten Arealen des Kortex und in den subkortikalen Strukturen liegt. Die Auswertung der Hirne mit kleinen Infarkten ergab in der Randzone und in der kontralateralen Hemisphäre eine Reduktion der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$. Die spezifischen Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Dichte in der direkten Infarktumgebung entsprechen möglicherweise der Penumbra. Die Veränderungen der Penumbra wurden auch von Eysel und anderen wissenschaftlichen Gruppen im visuellen Kortex nach Hitzeläsionen beobachtet (Eysel, 1997; Luhmann et al., 1996). Die Eigenschaften des Randareals Fr deuten darauf hin, dass hier eine Teilischämie stattgefunden hat. Dies äußert sich in Veränderungen, die analog zu den typischen Veränderungen der Periinfarktzone sind und sich nicht als reaktives Geschehen direkt auf die Ischämie zurückführen lassen.

6.3 Veränderungen nach großen Infarkten mit kortikalen und subkortikalen Strukturverlusten (Ischämiezeit: 60 min)

Das Muster der Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten bei großen Infarkten mit strukturellen kortikalen und subkortikalen Verlusten unterscheidet sich in weiten Teilen von dem bei kleinen Infarkten. Die vorliegende Studie zeigt spezifische regional veränderte Expressionsmuster der Untereinheiten nach fokalen kortikalen und subkortikalen Infarkten des Medialstromgebietes. Die differenzierte Reduktion der Rezeptoruntereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ in den intakten

Anteilen des Neokortex beider Hemisphären und die veränderte Zusammensetzung der Untereinheiten können sowohl die Affinität der Rezeptoren gegenüber den kortikalen Transmittern als auch die Funktion jedes einzelnen Rezeptors in den verschiedenen Gehirnregionen beeinflussen. Diese Befunde stehen mit einer Studie von Redecker et al. am Photothrombose-Modell im Einklang (Redecker et al., 2002). Immunhistochemische Studien an Affen zeigten, dass es sogar nach einseitigen peripheren monokulären Verlusten der afferenten kortikalen Verknüpfungen innerhalb von fünf Tagen zu einer Herunterregulation der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten $\alpha 1$ und $\gamma 2$ in den Kortexarealen kommt, die der eigentlichen Afferenz nicht direkt zugeordnet sind (Hendry et al., 1994).

In der aktuellen Studie können auch regional spezifische Unterschiede in der Verteilung der $\alpha 3$ -Untereinheit beobachtet werden. Es zeigt sich eine strenge Heraufregulation der $\alpha 3$ -Rezeptoruntereinheit im strukturell intakten Gewebe. Auffälligerweise ist diese Veränderung genau in den kontralateralen Arealen sehr ausgeprägt, die auf der ipsilateralen Seite durch die Ischämie vollständig zerstört worden sind. Vergleichende Untersuchungen der GABA_A-Rezeptor-Dichte zwischen Gehirnen neugeborener bzw. junger Ratten und Gehirnen alter Ratten zeigten, dass die quantitative Zusammensetzung der verschiedenen Untereinheiten verschoben worden ist. Die Rolle der $\alpha 3$ -Untereinheit während der postnatalen Entwicklung wurde 1992 von Laurie et al. untersucht. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die $\alpha 3$ - und $\gamma 2$ -Untereinheiten in den ersten Wochen nach der Geburt bei Ratten, die ständigen Lernvorgängen ausgesetzt sind, in höherem Maße exprimiert sind als bei den alten Ratten. Außerdem hatte sich die prozentuale Zusammensetzung im Laufe der Zeit zugunsten der $\alpha 1$ -Untereinheit verschoben (Zimprich et al., 1991). In einem gesunden Gehirn wird eine Heterogenität der $\alpha 3$ -Untereinheit mit anderen GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten beschrieben, welche in den kortikalen Anteilen in erster Linie durch die $\gamma 2$ -Untereinheit und einige β -Untereinheiten repräsentiert wird (Fritschy et al., 1995). Der umfassende physiologische Nutzen dieser Rezeptorheterogenität und Neuzu-

sammensetzung der Rezeptoren im Laufe des Alters und nach Läsionen ist nicht abschließend geklärt. Im Hinblick auf diese Studie könnte das lang anhaltende veränderte Expressionsmuster der $\alpha 3$ -Untereinheit nach großen kortikalen Infarkten eine Wiederaufnahme juveniler Entwicklungsstadien als adaptiven Prozess darstellen. Am ehesten lässt sich aus den Modifikationen ableiten, dass die Neukombination einen direkten Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der GABA_A-Rezeptoren hat (Angelotti and Macdonald, 1993; Sigel et al., 1990; Verdoorn et al., 1990; Verdoorn, 1994). Cramer und Chopp postulierten 2000, dass die Erholungsprozesse nach einem Hirninfarkt den Stadien der physiologischen postnatalen Entwicklungen entsprechen.

6.4 Funktionelle Bedeutung

6.4.1 Veränderungen im GABAergen System

Die ausgedehnten und lang anhaltenden Veränderungen in der Verteilung der Rezeptoruntereinheiten im GABAergen System decken sich mit elektrophysiologischen Studien, denen ähnliche Ischämie Modelle zugrunde gelegt worden sind (Mittmann, 1994; Domann et al., 1993; Neumann-Haefelin et al., 1995; Schiene et al., 1996; Buchkremer-Ratzmann und Witte, 1997; Witte und Stoll, 1997; Reinecke et al., 1999; Witte et al., 2000) sowie mit klinischen Untersuchungen, die eine Dysregulation des GABAergen Systems nach unilateraler Ischämie beschreiben (Liepert et al., 2000). In dieser Studie konnte eine ausgeprägte Reduktion der intrakortikalen inhibitorischen Aktivität nach fokaler ischämischer Läsion nachgewiesen werden.

Die Dysregulation des inhibitorischen Systems hat mehrere Konsequenzen. So könnten zum einen die in der vorliegenden Studie gefundenen Veränderungen der GABA_A-Rezeptoren zu gesteigerter zerebraler Krampfaktivität oder postischämischer Epilepsie beitragen. Bereits eine Blockierung von 10-20% der GABA-Rezeptoren durch den GABA-Antagonisten Biculline führt in vitro zu epileptogener Aktivität (Chagnac et al., 1989). Dies konnte am Tiermodell nach Induktion

einer fokalen Ischämie bestätigt werden (Kelly et al., 2001). Einigen klinischen Studien dokumentieren, dass sich bei 5-20% der Patienten, die einen Hirninfarkt erlitten haben, eine sekundäre Epilepsie entwickelt. Oft entwickelt sich diese mit einer Verzögerung von Monaten bis Jahren nach dem eigentlichen ischämischen Ereignis (Cocito et al., 1982; Kilpatrick et al., 1990; Kotila und Waldimo, 1992; So, 1996; Kessler et al., 2002). Demzufolge handelt sich um Langzeitveränderungen des inhibitorischen Systems. Interessanterweise konnte in klinischen Untersuchungen gezeigt werden, dass der Rückgang der inhibitorischen Aktivität mit elektrophysiologisch messbarer Hyperexzitabilität vor allem Patienten mit nachweisbarer kortikaler Läsion betraf. In weiteren Untersuchungen wurde an neurochirurgisch entferntem Gewebe von Patienten mit pharmakoresistenter Epilepsie und kortikalen Läsionen, wie zum Beispiel Gefäßmalformationen, um die Läsion herum eine ausgeprägte Hyperexzitabilität gemessen, die bei Patienten ohne kortikale Läsion nicht zu finden waren (Strowbridge et al., 1992). Dies steht im Einklang mit der aktuellen Studie, die eine Herunterregulation der Rezeptoruntereinheiten nach fokalen kortikalen ischämischen Läsionen zeigt. Auch der Mechanismus der bihemisphärischen Dysregulation stimmt mit klinischen Studien überein. Man konnte feststellen, dass bei vielen Patienten nach einem Hirninfarkt ein epileptogener Fokus nicht nur im Bereich der ischämischen Läsion, sondern teilweise auch in der gesunden kontralateralen Hemisphäre zu finden war (McNamara, 1994).

Eine wichtige Funktion der GABAergen Neurone ist die Modulation der rezeptiven Felder (Jones, 1993). Sie modulieren in diesem Fall die Antwort der rezeptiven Neurone auf Stimuli in sensorischen und nicht sensorischen Arealen. Die GABAergen Neurone dienen als Kontrolleinheit und bestimmen die Größe und Lokalisation des jeweiligen rezeptiven Feldes im sensomotorischen Kortex (Dykes, 1997). Durch eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen inhibitorischem GABAergem und exzitatorischem cholinergem System kann eine Langzeitveränderung in der Lokalisation und den Antworteigenschaften der rezeptiven

Felder erreicht werden. Dementsprechend bewirkt der Einsatz von GABA-Antagonisten eine deutliche Vergrößerung des rezeptiven Feldes im somatosensorischen Kortex (Hicks und Dykes, 1983; Dykes et al., 1984; Kyriazi et al., 1996). Basierend auf einem Rückgang der GABAergen Aktivität und einer höheren Exzitabilität verlieren die rezeptiven Felder ihre Spezifität, was auch bei Katzen mit fokaler Läsion am visuellen Kortex beschrieben wurde (Eysel et al., 1987; Eysel und Schmidt-Kastner, 1991). Bei Katzen ruft eine experimentell bedingte periphere sensorische Deafferierung eine Reduktion der GABAergen Inhibition in den zugeordneten Regionen des visuellen Kortex hervor, die mit einer Modulation der synaptischen Übertragung und einer Reorganisation der rezeptiven Felder einhergeht (Rosier et al., 1995). Analog dazu zeigten Experimente, dass nach Durchtrennung peripherer motorischer Nerven das dem durchtrennten Nerv zugeordnete motorische Areal Funktionen benachbarter motorischer Areale übernimmt. Auch in diesen Studien kommt es nach peripherer Läsion zu einer Neugestaltung der motorischen Felder im Kortex und das Innervationsgebiet dehnt sich auf benachbarte Körperteile aus (Jacobs und Donoghue, 1991). Den denkbaren Anpassungsmechanismus stellt die Aktivierung bereits bestehender „schlafender“ lateraler exzitatorischer Verbindungen durch die Reduktion der inhibitorischen Aktivität dar. Die intrakortikalen inhibitorischen Kreisläufe dienen demnach der Aufrechterhaltung oder auch der Neuformierung kortikaler motorischer Repräsentationsfelder nach Läsionen.

6.4.2 Veränderungen im teilischämischen Gewebe

Sowohl bei großen kortikalen Infarkten als auch bei den kleinen subkortikalen Infarkten kommt es im teilischämischen Gewebe zu spezifischen Veränderungen mit einer ausgeprägten Reduktion der Erregbarkeit (Neumann-Haefelin und Witte, 2000) und einer Beeinträchtigung der synaptischen Übertragung (Bolay und Dalkara, 1998). Gemeinsam mit der Dysregulation der Untereinheiten weisen diese Befunde auf eine erhebliche Dysfunktion innerhalb der Periinfarktzone hin. In diesem Zusammenhang sind auch die Studien von Nudo et al. erwähnenswert. Sie

zeigten, dass die Dysfunktionen nach fokaler ischämischer Läsion nicht auf das ischämische Areal beschränkt bleiben, sondern sich auf das gesamte umliegende Gewebe ausdehnen. Dies führt zu weit mehr Funktionsverlusten der benachbarten Regionen des Bewegungsapparates als das betroffene ischämische Areal erwarten ließe (Nudo et al., 1996). Durch gezieltes Training und Bahnung alternativer neuronaler Wege kann die Periinfarktzone in einem gewissen Rahmen reaktiviert werden (Witte, 1998). Es ist jedoch zu beachten, dass in einem kritischen Zeitfenster von einer Woche die dysfunktionelle kortikale Zone durch zu intensives Training der betroffenen Extremitäten noch vergrößert werden kann (Schallert et al., 1997; Kozlowski et al., 1996; Humm et al., 1998). Diesem Phänomen liegt möglicherweise eine überhöhte Glutamatausschüttung bei Reduktion der GABA-Rezeptoren und damit ein erhöhter Zelluntergang zu Grunde. In Weiterführung der vorliegenden Studie wäre es interessant, das teilischämische Gewebe nach rehabilitativem Training auf Änderungen der Verteilung der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten zu untersuchen.

6.4.3 Bedeutung für Rehabilitation und kortikale Plastizität

Hernandez und Gallager zeigten 1992, dass es mittels pharmakologischer Blockade der GABA-Rezeptoren zu einer verbesserten Funktionserholung nach Hirnläsionen kommt. Die Verringerung der kortikalen Inhibition zieht somit nicht nur negative Effekte wie die Epilepsieneigung und die Beeinträchtigung der spezifischen Informationsverarbeitung nach sich, sondern hat auch positive Folgen. Sie erhöht die Wirkung auf die kortikale Plastizität des geschädigten Gehirns. Dies führt zu einer verbesserten Reorganisation und Neubahnung. In elektrophysiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass es nach kortikalen ischämischen Läsionen zu einer gesteigerten Langzeitpotenzierung (LTP) kommt (Hagemann et al., 1998). Die LTP ist ein Phänomen, das den komplexen Lern- und Gedächtnisprozessen zugrunde liegt und in direktem Zusammenhang mit der neuronalen Plastizität steht (Bliss, 1996; Fazeli et al., 1993; Clark und Collingridge, 1996). Liepert zeigte 2000 in einer klinischen Studie die ausgedehnte Reduktion der

inhibitorischen Aktivität nach einem erlittenen Hirninfarkt auf, die sich mit Ergebnissen der aktuellen Studie vereinbaren lassen. Zwei Punkte sind hierbei von großer Bedeutung: Erstens war der primär motorische Kortex nicht direkt von der Läsion betroffen, dennoch kam es auch hier zu einem Rückgang der Inhibition. Zweitens weisen die Patienten mit geringen klinischen Defiziten wie zum Beispiel einer leichten Hemiparese aber gleich großem Infarktareal einen höheren Grad an Disinhibition auf als diejenigen mit schweren Defiziten, zum Beispiel einer Hemiplegie. Diese Befunde korrelieren mit den Ergebnissen anderer Studien, bei denen eine funktionelle Beeinträchtigung des GABAergen Systems beschrieben wird (Schiene et al., 1996; Qu et al., 1998b; Reinecke, 1999). Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei der reduzierten inhibitorischen Aktivität eher um einen Kompensationsmechanismus als um eine strukturelle Läsion von intrakortikalen inhibitorischen Neuronen. Die Disinhibition könnte somit einen grundlegenden Mechanismus für eine Erfolg versprechende Rehabilitation und Erholung nach fokaler Ischämie darstellen. Dies zeigten auch Manganotti et al. im Jahr 2002 in einer klinischen Studie. Sie wiesen nach, dass es bihemisphärisch zu einer lang anhaltenden, jedoch reversiblen Dysregulation des inhibitorischen Systems kommt. So kann durch vorübergehende erhöhte exzitatorische Aktivität eine bessere postischämische Funktionserholung mittels gesteigerter synaptischer Ansprechbarkeit, einen gesteigerten zerebralen Metabolismus für das geschädigte Gehirn erreicht werden.

Zahlreiche klinische Studien belegen die These, dass es sich bei den globalen Veränderungen in Form der Reduktion der inhibitorischen Aktivität um einen Kompensationsmechanismus handelt (Chollet et al., 1991; Weiller et al., 1992; Chollet und Weiller, 1994; Silvestrini et al., 1998; Nelles et al., 1999; Caramia et al., 2000). Es wurde nachgewiesen, dass es auch noch Monate nach einem unilateralen Hirninfarkt zu einer bihemisphärischen Aktivierung kommt, wenn die paretischen Extremitäten bewegt werden (Silvestrini et al., 1998). Diese bihemisphärischen Veränderungen stehen im Einklang mit den globalen Anpassungsmechanismen

der vorliegenden Studie, sowohl bei transienten Ischämien als auch bei manifesten Schlaganfällen.

7 Schlussfolgerungen

Nach transienter Okklusion der A. cerebri media mit variierender Infarktgröße, die abhängig vom Zeitpunkt der Revaskularisation ist, kommt es zu regional differenziellen bihemisphärischen Veränderungen der immunhistochemischen Anfärbbarkeit verschiedener GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten. Dies ist auf eine Änderung der Zusammensetzung der Untereinheiten und auf die Veränderung der Dichte der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\gamma 2$ zurückzuführen. Folglich sinkt die Affinität gegenüber dem inhibitorischen Transmitter GABA. Das Muster dieser Veränderungen korreliert mit der Größe des Infarkts. Nach kleinen Infarkten kommt es zu charakteristischen Modifikationen in den subkortikalen Strukturen der strukturell intakten ipsilateralen Hemisphäre. Davon abzugrenzen ist die Perinfarktzone, deren Veränderungen höchstwahrscheinlich auf eine Teilischämie zurückgehen. Die großen kortikalen Infarkte mit strukturellen Verlusten führen zu Veränderungen, die das gesamte kortikale, subkortikale, ischämische und nicht ischämische Netzwerk beider Hemisphären betreffen. Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang das veränderte Expressionsmuster der $\alpha 3$ -Untereinheit in der kontralateralen Hemisphäre, das eine Wiederaufnahme juveniler zerebraler Entwicklungsstadien im Sinne eines adaptiven Prozesses widerspiegelt. Diese Resultate stehen im Einklang mit Studien, die anhand anderer Modelle die postischämischen Veränderungen der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten untersuchten und es ist anzunehmen, dass die dysregulatorischen Modulationsprozesse den gleichen Ursprung haben.

Die Reduktion der kortikalen Inhibition könnte positive Effekte auf die Plastizität des geschädigten Gehirns haben und zu einer verbesserten kortikalen bzw. subkortikalen Reorganisation und Neubahnung führen. Die verminderte inhibitorische Aktivität ermöglicht die Erweiterung rezeptiver Felder und bahnt damit plastische Veränderungen in ausgedehnten Hirnregionen. Im Gegensatz dazu kann eine verminderte GABAerge Funktion aber auch negative Einflüsse im

Sinne einer gesteigerten Krampfaktivität oder einer postischämischen Epilepsie haben. Dies könnte die Entstehung von sekundären Epilepsien nach Hirninfarkten erklären, die in klinischen Studien gezeigt werden konnte.

8 Literaturverzeichnis

- Andrews RJ. 1991. Transhemispheric diaschisis. A review and comment. *Stroke*, 22 (7):943-949.
- Angelotti TP, Macdonald RL. 1993. Assembly of GABA_A receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci*, 13 (4):1429-1440.
- Backus KH, Arigoni M, Drescher U, Scheurer L, Malherbe P, Mohler H, Benson JA. 1993. Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor deduced from mutation-induced rectification. *Neuroreport*, 5 (3):285-288.
- Beesley JE, Foxwell N, Hall SR. 1993. X-ray microanalysis and single cell microfluorimetry for microscopical investigation of cellular reactions to pharmacological agents. *Cell Biol Int*, 17 (7):703.
- Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. 1996. Middle cerebral artery occlusion in (9):1616-1622; discussion 1623.
- Bliss TV. 1996. LTP and spatial learning the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*, 27. *J Physiol Paris*, 90 (5-6):335.
- Bloom FE, Iversen LL. 1971. Localizing 3H-GABA in nerve terminals of rat cerebral cortex by electron microscopic autoradiography. *Nature*, 229 (5287):628-630.
- Bohlhalter S, Weinmann O, Mohler H, Fritschy JM. 1996. Laminar compartmentalization of GABA_A-receptor subtypes in the spinal cord: an immunohistochemical study. *J Neurosci*, 16 (1):283-297.
- Bolay H, Dalkara T. 1998. Mechanisms of motor dysfunction after transient MCA occlusion: persistent transmission failure in cortical synapses is a major determinant. *Stroke*, 29 (9):1988-1993; discussion 1994.
- Boroojerdi B, Ziemann U, Chen R, Butefisch CM, Cohen LG. 2001. Mechanisms underlying human motor system plasticity. *Muscle Nerve*, 24 (5):602-613.
- Buchkremer-Ratzmann I, August M, Hagemann G, Witte OW. 1996. Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke*, 27 (6):1105-1109; discussion 1109-1111.
- Buchkremer-Ratzmann I, Witte OW. 1997. Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport*, 8 (2):519-522.
- Caramia MD, Palmieri MG, Giacomini P, Iani C, Dally L, Silvestrini M. 2000. Ipsilateral activation of the unaffected motor cortex in patients with hemiparetic stroke. *Clin Neurophysiol*, 111 (11):1990-1996.

- Chagnac-Amitai Y, Connors BW. 1989. Horizontal spread of synchronized activity in neocortex and its control by GABA-mediated inhibition. *J Neurophysiol*, 61 (4):747-758.
- Chen C, Blitz DM, Regehr WG. 2002. Contributions of receptor desensitization and saturation to plasticity at the retinogeniculate synapse. *Neuron*, 33 (5):779-788.
- Chen R, Yung D, Li JY. 2003. Organization of ipsilateral excitatory and inhibitory pathways in the human motor cortex. *J Neurophysiol*, 89 (3):1256-1264.
- Chollet F, DiPiero V, Wise RJ, Brooks DJ, Dolan RJ, Frackowiak RS. 1991. The functional anatomy of motor recovery after stroke in humans: a study with positron emission tomography. *Ann Neurol*, 29 (1):63-71.
- Chollet F, Weiller C. 1994. Imaging recovery of function following brain injury. *Curr Opin Neurobiol*, 4 (2):226-230.
- Clark KA, Collingridge GL. 1996. Evidence that heterosynaptic depolarization underlies associativity of long-term potentiation in rat hippocampus. *J Physiol*, 490 (Pt 2):455-462.
- Cocito L, Favale E, Reni L. 1982. Epileptic seizures in cerebral arterial occlusive disease. *Stroke*, 13 (2):189-195.
- Cooper SJ. 1989. Benzodiazepine receptor-mediated enhancement and inhibition of taste reactivity, food choice, and intake. *Ann N Y Acad Sci*, 575:321-336; discussion 336-327.
- Cramer SC, Basting EP. 2000. Mapping clinically relevant plasticity after stroke. *Neuropharmacology*, 39 (5):842-851.
- Cramer SC, Chopp M. 2000. Recovery recapitulates ontogeny. *Trends Neurosci*, 23 (6):265-271.
- De Blas AL. 1996. Brain GABA_A receptors studied with subunit-specific antibodies. *Mol Neurobiol*, 12 (1):55-71.
- Dobkin JA, Levine RL, Lagreze HL, Dulli DA, Nickles RJ, Rowe BR. 1989. Evidence for transhemispheric diaschisis in unilateral stroke. *Arch Neurol*, 46 (12):1333-1336.
- Domann R, Hagemann G, Kraemer M, Freund HJ, Witte OW. 1993. Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett*, 155 (1):69-72.
- Dykes RW, Landry P, Metherate R, Hicks TP. 1984. Functional role of GABA in cat primary somatosensory cortex: shaping receptive fields of cortical neurons. *J Neurophysiol*, 52 (6):1066-1093.
- Dykes RW. 1997. Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex. *Can J Physiol Pharmacol*, 75 (5):535-545.
- Eysel UT, Worgotter F, Pape HC. 1987. Local cortical lesions abolish lateral inhibition at direction selective cells in cat visual cortex. *Exp Brain Res*, 68 (3):606-612.

- Eysel UT, Schmidt-Kastner R. 1991. Neuronal dysfunction at the border of focal lesions in cat visual cortex. *Neurosci Lett*, 131 (1):45-48.
- Eysel UT. 1997. Perilesional cortical dysfunction and reorganization. *Adv Neurol*, 73:195-206.
- Fazeli MS, Corbet J, Dunn MJ, Dolphin AC, Bliss TV. 1993. Changes in protein synthesis accompanying long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. *J Neurosci*, 13 (4):1346-1353.
- Fritschy JM, Mohler H. 1995. GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: differential regional and cellular distribution of seven major subunits. *J Comp Neurol*, 359 (1):154-194.
- Fritschy JM, Weinmann O, Wenzel A, Benke D. 1998. Synapse-specific localization of NMDA and GABA(A) receptor subunits revealed by antigen-retrieval immunohistochemistry. *J Comp Neurol*, 390 (2):194-210.
- Fritschy JM, Meskenaite V, Weinmann O, Honer M, Benke D, Mohler H. 1999. GABAB-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. *Eur J Neurosci*, 11 (3):761-768.
- Gao B, Fritschy JM. 1994. Selective allocation of GABA_A receptors containing the alpha 1 subunit to neurochemically distinct subpopulations of rat hippocampal interneurons. *Eur J Neurosci*, 6 (5):837-853.
- Hagemann G, Redecker C, Neumann-Haefelin T, Freund HJ, Witte OW. 1998. Increased long-term potentiation in the surround of experimentally induced focal cortical infarction. *Ann Neurol*, 44 (2):255-258.
- Hallett M. 2001. Functional reorganization after lesions of the human brain: studies with transcranial magnetic stimulation. *Rev Neurol (Paris)*, 157 (8-9 Pt 1):822-826.
- Hallett M. 2001. Plasticity of the human motor cortex and recovery from stroke. *Brain Res Brain Res Rev*, 36 (2-3):169-174.
- Hamann GF. 2000. [Therapy of symptomatic stenosis of the cerebral arteries: how does one proceed?]. *Dtsch Med Wochenschr*, 125 (1-2):28-30.
- Hendry SH, Huntsman MM, Vinuela A, Mohler H, de Blas AL, Jones EG. 1994. GABA_A receptor subunit immunoreactivity in primate visual cortex: distribution in macaques and humans and regulation by visual input in adulthood. *J Neurosci*, 14 (4):2383-2401.
- Herholz K, Heiss WD. 2000. Functional imaging correlates of recovery after stroke in humans. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (12):1619-1631.
- Hernandez TD, Gallager DW. 1992. Development of long-term subsensitivity to GABA in dorsal raphe neurons of amygdala-kindled rats. *Brain Res*, 582 (2):221-225.
- Hevers W, Luddens H. 1998. The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol*, 18 (1):35-86.

- Hicks TP, Dykes RW. 1983. Receptive field size for certain neurons in primary somatosensory cortex is determined by GABA-mediated intracortical inhibition. *Brain Res*, 274 (1):160-164.
- Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Stat* 6: 75-70.
- Hossmann KA. 1993. Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death. *Prog Brain Res*, 96:161-177.
- Howard J, Thompson I. 1998. First class way to develop a brain. *Nature*, 396 (6708):219-221.
- Hsu SM, Ree HJ. 1980. Self-sandwich method. An improved immunoperoxidase technic for the detection of small amounts of antigens. *Am J Clin Pathol*, 74 (1):32-40.
- Humm JL, Kozlowski DA, James DC, Gotts JE, Schallert T. 1998. Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res*, 783 (2):286-292.
- Jacobs KM, Donoghue JP. 1991. Reshaping the cortical motor map by unmasking latent intracortical connections. *Science*, 251 (4996):944-947.
- Johansson BB. 2000. Brain plasticity and stroke rehabilitation. The Willis lecture. *Stroke*, 31 (1):223-230.
- Jones EG. 1993. GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates. *Cereb Cortex*, 3 (5):361-372.
- Kaupmann K, Huggel K, Heid J, Flor PJ, Bischoff S, Mickel SJ, McMaster G, Angst C, Bittiger H, Froestl W, Bettler B. 1997. Expression cloning of GABA(B) receptors uncovers similarity to metabotropic glutamate receptors. *Nature*, 386 (6622):239-246.
- Kayser F. 1998. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Kessler KR, Schnitzler A, Classen J, Benecke R. 2002. Reduced inhibition within primary motor cortex in patients with poststroke focal motor seizures. *Neurology*, 59 (7):1028-1033.
- Kilpatrick CJ, Davis SM, Tress BM, Rossiter SC, Hopper JL, Vandendriesen ML. 1990. Epileptic seizures in acute stroke. *Arch Neurol*, 47 (2):157-160.
- Koizumi S, Togo T, Hamada Y, Sadahiro M. 1986. [A technique for the enlargement of the small aortic annulus during valve replacement]. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*, 34 (10):1790-1794.
- Kotila M, Waltimo O. 1992. Epilepsy after stroke. *Epilepsia*, 33 (3):495-498.
- Kozlowski DA, James DC, Schallert T. 1996. Use-dependent exaggeration of neuronal injury after unilateral sensorimotor cortex lesions. *J Neurosci*, 16 (15):4776-4786.
- Kyriazi HT, Carvell GE, Brumberg JC, Simons DJ. 1996. Effects of baclofen and phaclofen on receptive field properties of rat whisker barrel neurons. *Brain Res*, 712 (2):325-328.
- Lagreze HL, Levine RL, Pedula KL, Nickles RJ, Sunderland JS, Rowe BR. 1987. Contralateral flow reduction in unilateral stroke: evidence for transhemispheric diaschisis. *Stroke*, 18 (5):882-886.

- Laurie DJ, Wisden W, Seeburg PH. 1992. The distribution of thirteen GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *J Neurosci*, 12 (11):4151-4172.
- Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW. 1999. The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature*, 399 (6738 Suppl):A7-14.
- Li H, Siegel RE, Schwartz RD. 1993. Rapid decline of GABA_A receptor subunit mRNA expression in hippocampus following transient cerebral ischemia in the gerbil. *Hippocampus*, 3 (4):527-537.
- Liepert J, Bauder H, Wolfgang HR, Miltner WH, Taub E, Weiller C. 2000. Treatment-induced cortical reorganization after stroke in humans. *Stroke*, 31 (6):1210-1216.
- Liepert J, Graef S, Uhde I, Leidner O, Weiller C. 2000. Training-induced changes of motor cortex representations in stroke patients. *Acta Neurol Scand*, 101 (5):321-326.
- Liepert J, Storch P, Fritsch A, Weiller C. 2000. Motor cortex disinhibition in acute stroke. *Clin Neurophysiol*, 111 (4):671-676.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. 1989. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, 20 (1):84-91.
- Luhmann HJ, Mittmann T, van Luijckelaar G, Heinemann U. 1995. Impairment of intracortical GABAergic inhibition in a rat model of absence epilepsy. *Epilepsy Res*, 22 (1):43-51.
- Luhmann HJ, Mudrick-Donnon LA, Mittmann T, Heinemann U. 1995. Ischaemia-induced long-term hyperexcitability in rat neocortex. *Eur J Neurosci*, 7 (2):180-191.
- Luhmann HJ, Mittmann T, Schmidt-Kastner R, Eysel UT, Mudrick-Donnon LA, Heinemann U. 1996. Hyperexcitability after focal lesions and transient ischemia in rat neocortex. *Epilepsy Res Suppl*, 12:119-128.
- Manganotti P, Patuzzo S, Cortese F, Palermo A, Smania N, Fiaschi A. 2002. Motor disinhibition in affected and unaffected hemisphere in the early period of recovery after stroke. *Clin Neurophysiol*, 113 (6):936-943.
- McNamara JO. 1994. Cellular and molecular basis of epilepsy. *J Neurosci*, 14 (6):3413-3425.
- Mies G, Kohno K, Hossmann KA. 1993. MK-801, a glutamate antagonist, lowers flow threshold for inhibition of protein synthesis after middle cerebral artery occlusion of rat. *Neurosci Lett*, 155 (1):65-68.
- Mittmann T, Luhmann HJ, Schmidt-Kastner R, Eysel UT, Weigel H, Heinemann U. 1994. Lesion-induced transient suppression of inhibitory function in rat neocortex in vitro. *Neuroscience*, 60 (4):891-906.
- Mittmann T, Qu M, Zilles K, Luhmann HJ. 1998. Long-term cellular dysfunction after focal cerebral ischemia: in vitro analyses. *Neuroscience*, 85 (1):15-27.
- Nelles G, Spiekermann G, Jueptner M, Leonhardt G, Muller S, Gerhard H, Diener HC. 1999. Reorganization of sensory and motor systems in hemiplegic stroke patients. A positron emission tomography study. *Stroke*, 30 (8):1510-1516.

- Neumann-Haefelin T, Hagemann G, Witte OW. 1995. Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro. *Neurosci Lett*, 193 (2):101-104.
- Neumann-Haefelin T, Witte OW. 2000. Periinfarct and remote excitability changes after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (1):45-52.
- Nudo RJ, Wise BM, SiFuentes F, Milliken GW. 1996. Neural substrates for the effects of rehabilitative training on motor recovery after ischemic infarct. *Science*, 272 (5269):1791-1794.
- Nudo RJ, Plautz EJ, Frost SB. 2001. Role of adaptive plasticity in recovery of function after damage to motor cortex. *Muscle Nerve*, 24 (8):1000-1019.
- Phan TG, Wright PM, Markus R, Howells DW, Davis SM, Donnan GA. 2002. Salvaging the ischaemic penumbra: more than just reperfusion? *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 29 (1-2):1-10.
- Pratt JA. 1992. The neuroanatomical basis of anxiety. *Pharmacol Ther*, 55 (2):149-181.
- Qu M, Buchkremer-Ratzmann I, Schiene K, Schroeter M, Witte OW, Zilles K. 1998. Bihemispheric reduction of GABA_A receptor binding following focal cortical photothrombotic lesions in the rat brain. *Brain Res*, 813 (2):374-380.
- Qu M, Mittmann T, Luhmann HJ, Schleicher A, Zilles K. 1998. Long-term changes of ionotropic glutamate and GABA receptors after unilateral permanent focal cerebral ischemia in the mouse brain. *Neuroscience*, 85 (1):29-43.
- Que M, Schiene K, Witte OW, Zilles K. 1999. Widespread up-regulation of N-methyl-D-aspartate receptors after focal photothrombotic lesion in rat brain. *Neurosci Lett*, 273 (2):77-80.
- Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW. 2000. Differential downregulation of GABA_A receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci*, 20 (13):5045-5053.
- Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW. 2002. Widespread and long-lasting alterations in GABA_A-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 22 (12):1463-1475.
- Reinecke S, Lutzenburg M, Hagemann G, Bruehl C, Neumann-Haefelin T, Witte OW. 1999. Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. *Neurosci Lett*, 261 (1-2):85-88.
- Reinecke S, Dinse HR, Reinke H, Witte OW. 2003. Induction of bilateral plasticity in sensory cortical maps by small unilateral cortical infarcts in rats. *Eur J Neurosci*, 17 (3):623-627.
- Rosier AM, Arckens L, Demeulemeester H, Orban GA, Eysel UT, Wu YJ, Vandesande F. 1995. Effect of sensory deafferentation on immunoreactivity of GABAergic cells and on GABA receptors in the adult cat visual cortex. *J Comp Neurol*, 359 (3):476-489.

- Schallert T, Kozlowski DA, Humm JL, Cocke RR. 1997. Use-dependent structural events in recovery of function. *Adv Neurol*, 73:229-238.
- Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qu M, Hagemann G, Kraemer M, Witte OW. 1996. Neuronal hyperexcitability and reduction of GABA_A-receptor expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 16 (5):906-914.
- Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. 2000. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (7):1011-1032.
- Shinno K, Zhang L, Eubanks JH, Carlen PL, Wallace MC. 1997. Transient ischemia induces an early decrease of synaptic transmission in CA1 neurons of rat hippocampus: electrophysiologic study in brain slices. *J Cereb Blood Flow Metab*, 17 (9):955-966.
- Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Hoger H, Adamiker D. 1999. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int*, 34 (5):379-385.
- Sigel E, Baur R, Trube G, Mohler H, Malherbe P. 1990. The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function. *Neuron*, 5 (5):703-711.
- Silvestrini M, Cupini LM, Placidi F, Diomedi M, Bernardi G. 1998. Bilateral hemispheric activation in the early recovery of motor function after stroke. *Stroke*, 29 (7):1305-1310.
- So EL, Annegers JF, Hauser WA, O'Brien PC, Whisnant JP. 1996. Population-based study of seizure disorders after cerebral infarction. *Neurology*, 46 (2):350-355.
- Somogyi P, Takagi H. 1982. A note on the use of picric acid-paraformaldehyde-glutaraldehyde fixative for correlated light and electron microscopic immunocytochemistry. *Neuroscience*, 7 (7):1779-1783.
- Stephens DN, Sarter M. 1988. Bidirectional nature of benzodiazepine receptor ligands extends to effects on vigilance. *Psychopharmacol Ser*, 6:205-217.
- Stowbridge BW, Masukawa LM, Spencer DD, Shepherd GM. 1992. Hyperexcitability associated with localizable lesions in epileptic patients. *Brain Res*, 587 (1):158-163.
- Thilmann R, Xie Y, Kleihues P, Kiessling M. 1986. Persistent inhibition of protein synthesis precedes delayed neuronal death in postischemic gerbil hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)*, 71 (1-2):88-93.
- Tretter V, Ehya N, Fuchs K, Sieghart W. 1997. Stoichiometry and assembly of a recombinant GABA_A receptor subtype. *J Neurosci*, 17 (8):2728-2737.
- Turek FW, Van Reeth O. 1988. Manipulation of the circadian clock with benzodiazepines: implications for altering the sleep-wake cycle. *Pharmacopsychiatry*, 21 (1):38-42.
- Verdoorn TA, Draguhn A, Ymer S, Seeburg PH, Sakmann B. 1990. Functional properties of recombinant rat GABA_A receptors depend upon subunit composition. *Neuron*, 4 (6):919-928.
- Verdoorn TA. 1994. Formation of heteromeric gamma-aminobutyric acid type A receptors containing two different alpha subunits. *Mol Pharmacol*, 45 (3):475-480.

- Von Monakow C. 1914. Localization in the brain and functional deficits caused by cortical lesions.
- Wagner S, Castel M, Gainer H, Yarom Y. 1997. GABA in the mammalian suprachiasmatic nucleus and its role in diurnal rhythmicity. *Nature*, 387 (6633):598-603.
- Weiller C, Chollet F, Friston KJ, Wise RJ, Frackowiak RS. 1992. Functional reorganization of the brain in recovery from striatocapsular infarction in man. *Ann Neurol*, 31 (5):463-472.
- Whiting PJ. 1999. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int*, 34 (5):387-390.
- Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH. 1992. The distribution of 13 GABA_A receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci*, 12 (3):1040-1062.
- Wisden W, Seeburg PH. 1992. GABA_A receptor channels: from subunits to functional entities. *Curr Opin Neurobiol*, 2 (3):263-269.
- Witte OW, Stoll G. 1997. Delayed and remote effects of focal cortical infarctions: secondary damage and reactive plasticity
- Witte OW. 1998. Lesion-induced plasticity as a potential mechanism for recovery and rehabilitative training. *Curr Opin Neurol*, 11 (6):655-662.
- Witte OW, Bidmon HJ, Schiene K, Redecker C, Hagemann G. 2000. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20 (8):1149-1165.
- Zilles K. 1992. The cortex of the rat. Berlin: Springer Verlag
- Zimprich F, Zezula J, Sieghart W, Lassmann H. 1991. Immunohistochemical localization of the alpha 1, alpha 2 and alpha 3 subunit of the GABA_A receptor in the rat brain. *Neurosci Lett*, 127 (1):125-128.

9 Danksagung

Herrn PD Dr. med. Christoph Redecker, Oberarzt der Neurologischen Klinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die Überlassung des Themas und die Einführung in den wissenschaftlichen Hintergrund. Ihm möchte ich auch für die umfassende Betreuung und produktiven Zusammenarbeit danken, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglichten.

Herrn Prof. O. W. Witte, Chefarzt der Neurologischen Klinik der Friedrich-Schiller-Universität Jena, danke ich für die notwendigen Materialien, die mir zur Verfügung gestellt wurden und die Möglichkeit, in seinem Labor bei angenehmen Arbeitsklima wissenschaftlich zu arbeiten.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurologie“ der Friedrich-Schiller-Universität Jena danke ich für die weiterführenden und anregenden Diskussionen und die ständige Bereitschaft zu Hilfestellungen.

Volker Sonn danke ich für die Perspektive des Fachfremden und dafür, dass es ihn gibt.

Ich möchte auch Sebastian, Severin und allen Freunden danken, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern Silvia und Hans-Henning Schindler, deren Unterstützung und Rückhalt mich durch meine gesamte Studienzeit begleitet haben.

10 Lebenslauf

Name: Schindler

Vorname: Silvia, Sigrid

Geburtsdatum/-ort: Stuttgart, Bad Cannstatt

Schulbildung: 1980-1984 Merzschule Stuttgart (Grundschule)

1984-1991 St. Agnes Gymnasium, Stuttgart

1991-1993 Merzschule Stuttgart

Schulabschluss: 1993 Allgemeine Hochschulreife,
Merzschule Stuttgart

Berufsausbildung: 1993-1996 Ausbildung zur Physiotherapeutin,
Lehranstalt für Physiotherapie der DAA, Lahr

1996-1997 Anerkennungspraktikum zur Physio-
therapeutin, städtisches Krankenhaus Überlingen

Hochschulstudium: 1997-2004 Studium der Humanmedizin,
Friedrich-Schiller-Universität Jena

11/2004 Abschluss des Studiums als Arzt

Stuttgart, 10.2.2005

Sigrid Schindler

11 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass

- mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist,
- ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir genutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,
- mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. C. Redecker; Prof. Dr. O. W. Witte.
- die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen
- und ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Stuttgart, 10.2.2005

Sigrid Schindler